

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
27 février 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/016563 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68,
A61K 31/708, 31/519, 31/437, A61P 25/28, 9/10, 37/00

(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/02861

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 13 août 2002 (13.08.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Données relatives à la priorité :
01/10819 14 août 2001 (14.08.2001) FR

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

(63) Apparenté(e) par continuation (CON) ou par continuation partielle (CIP) à une demande antérieure :
US 09/983,754 (CIP)
Déposée le Non communiquée

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : EX-ONHIT THERAPEUTICS SA [FR/FR]; 26, rue Brunel, F-75017 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : AÏT IKHLEF, Ali [FR/FR]; 1, rue de l'Eglise, 91940 Gometz Le Châtel (FR). RESINK, Annelies [NL/FR]; 48, rue Bobillot, F-75013 Paris (FR). SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 38, avenue Paul Déroulède, F-94300 Vincennes (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL MOLECULAR TARGET FOR NEUROTOXICITY

(54) Titre : NOUVELLE CIBLE MOLECULAIRE DE LA NEUROTOXICITE

WO 03/016563 A2

(57) Abstract: The invention relates to the field of biology, genetics and medicine and to novel methods of detecting, characterising and/or treating (or managing) neurodegenerative pathologies, particularly amyotrophic lateral sclerosis. Said invention also relates to methods of identifying or screening active compounds in said pathologies. Moreover, the invention relates to compounds, genes, cells, plasmids or compositions that can be used to carry out the above-mentioned methods. In particular, the invention outlines the role of PDE4B in said pathologies and the use thereof as a therapeutic, diagnostic or experimental target.

(57) Abrégé : La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en oeuvre des méthodes ci-dessus. L'invention décrit notamment le rôle de PDE4B dans ces pathologies et son utilisation comme cible thérapeutique, diagnostique ou expérimentale.

Nouvelle Cible Moléculaire de la Neurotoxicité

La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus. L'invention découle notamment de l'identification du rôle de la phosphodiestérase 4B dans ces pathologies et décrit son utilisation comme cible ou marqueur thérapeutique, diagnostique ou expérimental de ces désordres.

- De nombreuses pathologies neurodégénératives ont été décrites comme ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'excitotoxicité. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques et de la chorée de Huntington.
- La sclérose amyotrophique latérale (SAL ou ALS pour Amyotrophic Lateral Sclerosis) est une maladie neurodégénérative associée à différents types d'inclusions tels les corps de Lewy et caractérisée par une apoptose des motoneurones spinaux et corticaux dont l'issue fatale est parfois associée à une démence frontale. Des formes sporadiques, sans aucune mutation décrite, coexistent avec des formes familiales (FALS) associées à des mutations dans le gène SOD1 codant pour la superoxyde dismutase. La majorité des cas est sporadique, les formes familiales (FALS) étant très rares. Il est vraisemblable qu'une longue période asymptomatique précède l'apparition des symptômes cliniques qui sont variés et dont la classification est complexe. Les futurs développements thérapeutiques substitueront aux traitements de la symptomatologie des stratégies basées sur les causes moléculaires de la pathologie. Au niveau cellulaire, ces symptômes sont associés à une mort des

motoneurones corticaux et des motoneurones spinaux. Cette mort neuronale a été reliée à différents phénomènes qui constituent la base de plusieurs pathologies neurodégénératives. C'est le cas de l'excitotoxicité liée au glutamate, du stress oxydatif, d'une certaine auto immunité dirigée contre des 5 marqueurs neuronaux (les canaux calciques dans le cas de l'ALS) ainsi que d'anomalies du cytosquelette. Si ces phénomènes sont décrits, la ou les causes de ces maladies, dont l'ALS, sont obscures. Même si les FALS sont liées à des mutations dans le gène SOD1 qui code pour la superoxyde dismutase, les mécanismes qui engagent les neurones vers la mort cellulaire dont au moins 10 une composante est l'apoptose, sont inconnus.

L'identification des évènements moléculaires impliqués dans les différents phénomènes impliqués dans la mort cellulaire permettra de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'étude de ces évènements est 15 difficilement réalisable à partir de biopsies humaines. Ces biopsies proviennent évidemment d'échantillons post-mortem dont la qualité est difficilement contrôlable et ne représentent que des états pathologiques représentatifs des phases tardives de la maladie.

20 Les modèles animaux donnent accès à des échantillons biologiques qui permettent d'analyser différentes étapes du développement d'une pathologie et de comparer ces étapes à des témoins sains. A cet égard, des souris transgéniques qui expriment le gène humain SOD1 portant l'une des mutations qui prévaut dans les FALS (mutation G93A) sont disponibles auprès de Jackson 25 Laboratory, sous condition de prise d'une licence d'utilisation auprès de la NorthWestern University. Ce modèle reproduit en 120 jours l'issue fatale de la maladie avec des symptômes comparables à ceux de la maladie humaine. L'apparition des symptômes d'ALS liés à la mutation G93A dans SOD1 n'est pas la conséquence d'une réduction de l'activité superoxyde dismutase mais 30 d'un gain de fonction qui augmente la capacité de l'enzyme à générer des radicaux libres. Malgré ces informations, les évènements moléculaires qui président aux différentes étapes de l'ALS sont mal connus. La complexité de

ces évènements moléculaires reflète l'évolution de la pathologie : Dans le modèle transgénique étudié, aucune dérégulation neuronale ou manifestation clinique n'a été rapportée à 30 jours. 60 jours correspondent à un stade qui précède de peu les premiers symptômes, mais qui est déjà caractérisé au 5 niveau cérébral par des changements dans la physiologie cellulaire tels qu'une altération du métabolisme mitochondrial, un stress et une mort neuronale associés à un phénomène d'excitotoxicité. A 90 jours, 50% des motoneurones corticaux et spinaux sont morts et un processus actif d'apoptose neuronale est engagé parallèlement à une activation astrocytaire. Le phénomène 10 d'excitotoxicité n'est plus observé à ce stade. La mort neuronale y est associée à l'activation de caspases qui ne semblent pas impliquées dans les phases précoce de la pathologie.

Identifier les différents évènements moléculaires spécifiques des différentes 15 phases de la pathologie doit permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques aussi bien que de nouveaux marqueurs diagnostiques. L'une des approches les plus efficaces pour réaliser cette identification consiste à identifier les gènes et les protéines dont l'expression caractérise un état physiopathologique.

La présente invention décrit à présent l'identification d'événements génétiques 20 impliqués dans le phénomène d'excitotoxicité et de mort neuronale. La présente invention fournit ainsi de nouvelles approches thérapeutiques et diagnostiques des pathologies associées à ces phénomènes, ainsi que de 25 nouvelles cibles pour l'identification de composés actifs.

Plus particulièrement, une analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN extraits d'échantillons de cerveau et de moelle épinière, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum 30 d'événements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie. Cette analyse a été effectuée par criblage différentiel qualitatif selon la

technique DATAS (décrite dans la demande n° WO99/46403), qui présente des avantages inégalés.

La présente demande de brevet découle notamment de la construction par la demanderesse d'un répertoire des altérations d'épissage dans le cerveau des animaux modèles de l'ALS âgés de 60 jours. Ce répertoire, qui contient plus de 200 séquences distinctes, implique des acteurs clefs du phénomène d'excitotoxicité tels que les canaux potassiques et le récepteur NMDA. Des séquences dérivées d'ARNs codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress, dont des protéines de choc thermique, font également partie de ce répertoire, soulignant l'implication de cette réponse dans les phases précoces de l'ALS. Une altération du métabolisme énergétique apparaît clairement affecter les motoneurones corticaux des animaux qui développent la pathologie. Par exemple, l'intron 6 de la forme mitochondriale de la créatine kinase est isolé spécifiquement à partir des ARN messagers exprimés en conditions pathologiques chez les animaux âgés de 60 jours. Cette interruption de la séquence codante par cette rétention d'intron aboutit à un ARN messager qui code pour une forme inactive de l'enzyme. Cette observation est en accord avec les observations biochimiques qui ont montré une diminution de l'activité créatine kinase mitochondriale corrélée avec une diminution de la quantité de cette enzyme dans les neurones des animaux du même modèle transgénique. La spécificité des séquences qui constituent ce répertoire est attestée par le fait que la même analyse différentielle qualitative de l'expression génétique réalisée sur des animaux âgés de 90 jours aboutit à un répertoire différent dont sont absents notamment les différents marqueurs de l'excitotoxicité. L'analyse des modifications d'épissage confirme que les évènements moléculaires sont différents selon le stade de la pathologie.

De manière particulièrement intéressante et inattendue, la réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B. Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les

animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment recouvre les nucléotides 377 à 486 référencés à partir du codon stop de la PDE4B de souris (SEQ ID NO :1) (séquence également accessible dans GenBank, n°AF208023).

5 Cette séquence comprend 2912 bases, le fragment délété correspondant aux bases 2760 à 2869. Cette région est non codante et est exprimée différentiellement entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques, du fait de l'utilisation alternative d'un exon 3' non codant ou du fait de l'utilisation de deux sites de polyadénylation alternatifs. Cette expression différentielle a été
10 mise en évidence par des expériences de RT PCR présentées sur les figures 1A et 1B.

La présente demande démontre donc l'implication de la phosphodiestérase 4B dans le développement des processus d'excitotoxicité et de mort neuronale. Les
15 résultats obtenus montrent une expression plus prononcée de PDE4B dans les tissus nerveux pathologiques, liée à une modification structurale de l'ARN correspondant, notamment à la délétion d'une région dans la partie 3' non-codante. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS. Leur
20 délétion de l'ARNm de la PDE4B, par épissage ou par utilisation de séquences de polyadénylation alternatives, peut aboutir à une stabilisation, donc à une augmentation de l'expression de la partie codante de cet ARN. Cet événement se produit spécifiquement dans le cerveau des sujets pathologiques et non dans les sujets contrôles.

25 La présente invention décrit donc un événement moléculaire original qui aboutit à une augmentation de l'expression de l'ARNm de la PDE4B dans le cerveau des sujets pathologiques et qui est corrélé dans le temps avec le phénomène d'excitotoxicité et/ou de mort neuronale. L'invention montre également, pour la première fois, qu'une augmentation de l'expression de la PDE4B est associée
30 aux stades précoce de l'ALS. La PDE4B constitue donc une cible thérapeutique nouvelle et importante dans le développement de thérapeutiques de ces pathologies, utilisables notamment à des phases précoce de leur

développement, et s'adressant aux véritables bases moléculaires de la pathologie et non aux symptômes ou composantes inflammatoires associées. L'invention décrit également de nouvelles méthodes de diagnostic, dépistage, détection, détermination d'une prédisposition ou de suivi de l'évolution ou de 5 l'efficacité du traitement de ces pathologies.

Détection, Diagnostic et dépistage

Un objet de l'invention réside donc dans une méthode de détection d'une 10 situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure *in vitro* de l'expression de la phosphodiestérase 4, notamment de la phosphodiestérase 4B dans un échantillon provenant du sujet. La méthode comprend avantageusement une mesure de l'expression différentielle de la 15 région 3' non-codante du gène PDE4B et du reste du gène, notamment de la partie codante.

Un autre objet de l'invention réside donc dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la détection de la présence d'une forme mutée de l'ARN de la phosphodiestérase 20 4, notamment de la phosphodiestérase 4B dans un échantillon provenant du sujet, en particulier d'une forme délétée de tout ou partie de la région 3' non-codante.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un acide nucléique 25 comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN messager de la PDE4B pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou de détection d'une situation de stress neuronal et plus particulièrement la situation d'excitotoxicité.

30 L'invention réside, généralement, dans l'utilisation d'un acide nucléique complémentaire de tout ou partie du gène ou du messager de la PDE4B, pour la détection d'événements pathologiques de type excitotoxicité, stress ou mort

neuronale, etc. Plus généralement, l'invention repose sur une méthode de diagnostic, dépistage, caractérisation ou suivi d'une pathologie dégénérative, comprenant la mise en évidence d'une altération dans le gène PDE4 ou dans l'ARN correspondant, typiquement PDE4B.

5

L'expression de la PDE4, ou le différentiel d'expression, ou la présence d'une forme altérée peuvent être déterminés par des techniques conventionnelles de biologie moléculaire, comme par exemple par séquençage, hybridation, amplification, RT-PCR, migration sur gel, etc. L'invention est applicable au 10 diagnostic ou la détection de différentes pathologies impliquant les phénomènes d'excitotoxicité, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques, l'ALS, la chorée de Huntington ou l'ischémie cérébrale. Elle peut être utilisée pour la détection précoce, la mise en évidence d'une prédisposition, le choix et l'adaptation d'un traitement, le suivi de l'évolution de 15 la pathologie, etc. Elle est particulièrement adaptée à la détection à un stade précoce de la sclérose en plaques ou de l'ALS.

Pour la mise en œuvre des méthodes génétiques de diagnostic ou de détection selon l'invention, on utilise plus particulièrement des acides nucléiques capables 20 de mettre en évidence une forme délétée de l'ARNm de la PDE4B, notamment une forme dépourvue de tout ou partie de la région 3' non codante. A titre d'exemple spécifique, on utilise un acide nucléique complémentaire de tout ou partie de la région comprise entre les résidus 2760 à 2869 de la séquence SEQ ID NO :1, ou des résidus correspondants de la séquence du gène ou de l'ARNm 25 de la PDE4B humaine. La séquence de l'ADNc codant la PDE4B humaine et de la protéine correspondante sont représentées dans les séquences SEQ ID NO : 3 et 4 (voir également Genbank, n° NM_002600). La région 3' non-codante de l'ARN ou du gène PDE4B humain correspond aux résidus 2461 à 4068 de SEQ ID NO :3.

30

Avantageusement, l'acide nucléique utilisé (comme sonde) comprend tout ou partie de la séquence codant la région 3' non-codante du gène ou de l'ARN de

la PDE4B comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides 2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou une séquence complémentaire de celles-ci.

- 5 Selon des modes particuliers de mise en œuvre, l'invention utilise un acide nucléique complémentaire d'une région comprise dans une séquence suivante :
- résidus 2384 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2500 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2760 à 2869 de SEQ ID n° 1
 - 10 - résidus 2780 à 2850 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2790 à 2810 de SEQ ID n° 1
 - résidus 2600 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - résidus 3000 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - résidus 3500 à 4040 de SEQ ID n° 3
 - 15 - résidus 3900 à 4040 de SEQ ID n° 3.

Selon un autre mode particulier, on utilise un acide nucléique complémentaire de la séquence de la région de l'ARN de PDE4 résultant de la délétion de tout ou partie de la partie 3' non codante. L'élimination d'un domaine créé en effet de 20 nouvelles jonctions dans la séquence, qui sont spécifiques de la forme déletée et peuvent être utilisées pour mettre en évidence la présence d'une telle forme dans un échantillon.

La complémentarité entre la sonde et la séquence cible est, de préférence, 25 parfaite pour assurer une meilleure spécificité d'hybridation. Toutefois, il est entendu que certains mésappariements peuvent être tolérés. L'acide nucléique utilisé pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus peut être un ADN ou un ARN, de préférence un ADN d'origine synthétique. Il comporte de préférence de 30 10 à 500 bases, typiquement de 10 à 100 bases. Il est entendu qu'un acide nucléique plus long peut être utilisé, si désiré, bien que cela ne soit pas préféré. L'acide nucléique est avantagusement un ADN simple brin, de 10 à 500 bases, complémentaire d'une région au moins de la séquence 3'-non codante de la

PDE4B. L'acide nucléique peut être marqué, par exemple par voie radioactive, enzymatique, luminescente, fluorescente, chimique, etc.

Une autre approche pour détecter la présence d'une altération du gène PDE4
5 utilise une amorce ou un couple d'amorces nucléiques permettant une amplification sélective d'une portion de l'ARN PDE4, de préférence comprenant une portion de la région 3' non codante. On utilise typiquement une amorce permettant l'amplification sélective de la forme altérée de l'ARN de PDE4, notamment d'une amorce spécifique de la jonction créée par l'élimination du
10 partie de la région 3' de l'ARN.

A cet égard, un objet de l'invention réside dans une amorce complémentaire d'une partie de la région 3' non-codante de la PDE4B, et permettant l'amplification d'une partie de cette région. L'amorce comporte avantageusement de 8 à 20 bases. Elle est préférentiellement composée d'un fragment de 8 à 20 résidus consécutifs de la séquence comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides 2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou d'une séquence complémentaire de celles-ci. Un autre objet de l'invention réside dans un couple d'amorce
15 permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région 3' non-codante de la PDE4, le dit couple comprenant au moins une amorce telle que définie ci-dessus.
20

Pour la mise en œuvre des méthodes selon l'invention, on met en contact in
vitro un échantillon biologique d'un sujet, contenant un acide nucléique, avec un acide nucléique (sonde, amorce, etc.) tel que défini ci-dessus, et on détecte la formation d'un hybride ou d'un produit d'amplification. L'échantillon biologique peut être un échantillon de sang, de fluide, de cellule, de tissu, etc. L'acide nucléique peut être immobilisé sur un support, de type verre, silice, nylon, etc.
25

Le procédé de détection, dépistage ou diagnostic peut être mis en œuvre à partir de différents types d'échantillons provenant d'un sujet, comme par
30

exemple des biopsies de tissus, notamment de tissu nerveux. De manière particulièrement surprenante et avantageuse, la présente invention montre par ailleurs que la dérégulation de l'expression de PDE4, corrélée au phénomène d'excitotoxicité, peut être mise en évidence directement dans le tissu musculaire. Ceci est tout particulièrement remarquable dans le cas de pathologies neurodégénératives telles que l'ALS.

Au cours du développement de l'ALS, les phénomènes dégénératifs se produisent non seulement dans le cerveau mais également dans la moelle épinière et en conséquence dans le muscle par défaut d'innervation. La figure 2 présente les modifications d'expression de l'ARNm de la PDE4B dans les muscles de souris contrôles et transgéniques, suivies en utilisant les mêmes amorces de PCR que lors de l'étude sur les ARN de cerveaux de ces mêmes animaux. De façon analogue, toutefois moins prononcée, une diminution de l'expression de la région 3' non codante de la PDE4B, et non du reste de cet ARNm (notamment la partie codante), est observée spécifiquement dans le muscle des animaux en fin de phase pré-symptomatique, c'est à dire âgés de 90 jours.

L'une des difficultés rencontrées lors des études et des traitements de l'ALS est la difficulté de poser un diagnostic précoce. Cette observation de dérégulation de l'ARNm de la PDE4B dans le muscle ALS permet de proposer un diagnostic précoce à partir de biopsies musculaires de patients. Ce diagnostic est basé sur la détection de l'expression différentielle de la région 3' non codante et du reste de la séquence, notamment codante, de la PDE4B.

Un procédé particulier de détection d'une situation de stress neuronal, notamment d'excitotoxicité, en particulier liée à une pathologie neurodégénérative chez un sujet, comprend la mesure de l'expression du gène PDE4B, ou de la présence de formes délétées du messager de PDE4B, dans un échantillon de cellules musculaires provenant dudit sujet.

Pour mesurer l'expression différentielle, on utilise par exemple une sonde correspondant à (c'est-à-dire spécifique de) une partie de la région 3' non codante et une sonde correspondant à une partie de la région codante de la PDE4B. Le signal détecté avec chacune de ces sondes permet d'évaluer le différentiel d'expression. Une autre approche utilise deux couples d'amorces permettant une amplification d'une portion de la région 3' non codante d'une part et d'une partie de la région codante d'autre part.

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit comprenant une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région 3' non-codante et une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région codante.

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit comprenant un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région 3' non-codante de la PDE4 et un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région codante de la PDE4.

Thérapie

Les phosphodiestérases hydrolysent les acides nucléiques cycliques tels l'AMPc et le GMPc, régulant différentes cascades de signalisation. La PDE4B hydrolyse l'AMPc, régulant ainsi la concentration intracellulaire de ce second messager. L'implication de l'AMPc dans la balance qui existe entre la viabilité cellulaire et l'apoptose est bien décrite dans la littérature. Notamment, la cascade AMPc est bien intégrée dans les cascades de survie cellulaire impliquant des kinases telles Akt et PI3K, de même que dans la régulation de l'activité du facteur de transcription CREB. Il est à noter que ce facteur de transcription est impliqué dans la survie neuronale et la croissance des neurites. Toutefois, l'utilisation

- d'inhibiteurs de PDE et avantageusement de PDE4 n'a jamais été envisagée pour améliorer la viabilité neuronale et plus particulièrement leur protection contre l'excitotoxicité. Les inhibiteurs de PDE4, développés pour inhiber les phénomènes inflammatoires, ont été suggérés comme potentiellement utiles 5 dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Cette suggestion s'appuie sur la volonté de réduire les inflammations qui sont observées dans le cerveau au cours des processus neurodégénératifs et nullement sur un rationnel visant à inhiber directement la mort neuronale.
- 10 La présente invention montre l'existence d'événements d'épissage ou de sites de polyadénylation alternatifs affectant le gène de la PDE4, associés au développement de l'excitotoxicité neuronale, et fournit la base moléculaire qui justifie l'utilisation d'inhibiteurs de PDE4 pour le traitement de l'ALS et plus généralement pour améliorer la viabilité neuronale lors des phénomènes 15 d'excitotoxicité, en particulier dès les phases précoces de ces pathologies.

Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un composé capable d'inhiber ou de réduire l'expression ou l'activité de la PDE4B, pour la préparation d'une composition destinée au traitement des maladies 20 neurodégénératives, notamment en phase précoce, plus préférentiellement pour réduire l'excitotoxicité neuronale précoce associée aux maladies neurodégénératives telles l'ALS, Alzheimer ou Parkinson.

Un objet particulier réside dans l'utilisation d'un inhibiteur de PDE4 pour la 25 préparation d'une composition destinée au traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité chez les sujets atteints d'ALS ou pour augmenter la survie neuronale chez les sujets atteints d'ALS.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé capable 30 d'inhiber (de préférence de manière sélective) l'expression ou l'activité de la PDE4B de séquence SEQ ID n° 2 ou 4 pour la préparation d'une composition destinée à réduire l'excitotoxicité neuronale.

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement d'une pathologie associée à un stress neuronal, notamment à une excitotoxicité, comprenant l'administration à un sujet d'un composé inhibiteur de l'activité ou 5 de l'expression de la PDE4B, de préférence un composé inhibiteur sélectif de PDE4.

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement de l'ALS, notamment dans une méthode pour augmenter la survie des neurones chez des 10 patients atteints d'ALS, comprenant l'administration à un sujet d'un inhibiteur de PDE4, de préférence un composé inhibiteur sélectif de PDE4.

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de 15 la souffrance, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie), etc. Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements, notamment adressant les événements tardifs de la pathologie, tels que des inhibiteurs de caspases ou autres composés actifs.

20 Le composé utilisé peut être tout composé capable d'inhiber l'expression de la PDE4, notamment la PDE4B, c'est-à-dire en particulier tout composé inhibant la transcription du gène, la maturation des ARNs, la traduction de l'ARNm, la modification post-traductionnelle de la protéine, etc. Il peut s'agir d'un composé inhibant la modification de l'ARN, notamment la délétion d'une partie de la 25 région 3' non-codante.

Dans un mode de réalisation particulier, le composé est un acide nucléique anti-sens, capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou la traduction du messager correspondant. L'acide nucléique anti-sens peut comprendre tout ou 30 partie de la séquence du gène de la PDE4B, d'un fragment de celle-ci, du messager de la PDE4B, ou d'une séquence complémentaire à celles-ci. L'antisens peut notamment comprendre une région complémentaire de la

séquence comprise entre les résidus 218-2383 de SEQ ID NO :1 ou 766-2460 de SEQ ID NO :3, et inhiber (ou réduire) sa traduction en protéine. L'antisens peut être un ADN, un ARN, un ribozyme, etc. Il peut être simple-brin ou double-brin. Il peut également s'agir d'un ARN codé par un gène antisens. S'agissant 5 d'un oligonucléotide antisens, il comprend typiquement moins de 100 bases, par exemple de l'ordre de 10 à 50 bases. Cet oligonucléotide peut être modifié pour améliorer sa stabilité, sa résistance aux nucléases, sa pénétration cellulaire, etc.

Selon un autre mode de réalisation, le composé est un peptide, par exemple 10 comprenant une région de la protéine PDE4 (notamment PDE4B) et capable d'antagoniser son activité.

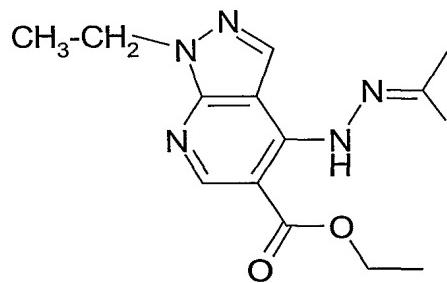
Selon un autre mode de réalisation, le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique, notamment une molécule organique ou 15 inorganique, d'origine végétale, bactérienne, virale, animale, eucaryote, synthétique ou semi-synthétique, capable de moduler l'expression ou l'activité de la PDE4B.

Dans une variante préférée, on utilise un composé de synthèse, inhibiteur de 20 PDE4. Différents types d'inhibiteurs peuvent être mis en oeuvre. Il s'agit préférentiellement de composés de la famille des pyrazolopyridines, parmi lesquels figure notamment l'étazolate, ou de composés de la famille des dérivés de xanthine (ou 2,6-dioxopurine), parmi lesquels figure notamment la pentoxifylline.

25

Les composés de la famille des pyrazolopyridines sont en particulier choisis parmi les composés suivants :

L'étazolate de formule suivante :



Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (tracazolate),

5

Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique

1-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-β-D-1-deoxy-ribofuranose

10

Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-(N'-isopropylidene-hydrazino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (SQ 20009),

4-amino-6-methyl-1-n-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine

15

Ester éthylique de l'acide 4-Amino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (desbutyl tracacolate),

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

20

Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-methylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-propyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-ethylamino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

30

Ester éthylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

5-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-2-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-ol,

35

ester allylique de l'acide 1-allyl-4-amino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

40

ester éthylique de l'acide 4-amino-1-ethyl-3,6-dimethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester éthylique de l'acide 4-dimethylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5 ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 10 ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-but-3-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 15 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-isopropylamide,
- 4-amino-1-pentyl-N-n-propyl-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- 20 ester allylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 30 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo<3,4-*b*>pyridine-5-N-(2-propenyl)carboxamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 35 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-ynyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 40 ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-enyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 45 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5 ester isobutylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,
- 10 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-but-2-enyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylamide,
- 15 ethyl 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-hydroxamate,
- est 15 ester prop-2-ynylque de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 20 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-propylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,
- est 30 2-méthyl-allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-Amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide (ICI 190,622),
- 4-amino-1-pent-4-ynyl-N-2-propenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- 35 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-but-2-ynylamide,
- 40 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-(2-cyclopropyl-ethyl)-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 45 ester allylique de l'acide 4-amino-1-hex-5-ynyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,
ester but-3-ényle de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
5 ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
4-butylamino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
10 ester 2-cyclopropyl-éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
15 ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
ester cyclopropylmethylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
20 ester éthylique de l'acide 4-amino-1-benzyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-benzylamide,
25 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-phenylamide,
ester benzylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
30 4-Azido-1-β-D-ribofuranosylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine,
1-pent-3-ynyl-N-2-propenyl-4-propionamido-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
35 2-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3,4-diol,
2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-ethanol,
40 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propan-1-ol,
ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-acétique,
45 ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propionique,

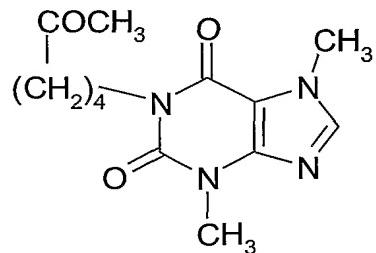
- ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,
- 5 ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-benzoïque,
- ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,
- 10 *N*-benzylidene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
N-furan-2-ylmethylene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 15 *N*-(4-fluoro-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
N-(3-furan-2-yl-allylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 20 20 *N*-(4-methoxy-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 25 4-[(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazonomethyl]-benzonitrile,
N-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 30 30 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-nitro-benzylidene)-hydrazine,
N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-nitro-benzylidene)-hydrazine,
- 35 35 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,
N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(5-nitro-furan-2-ylmethylene)-hydrazine,
- 40 40 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,
N-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(6-nitro-
- 45 45 benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-hydrazine,

- Acide 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(pyridin-4-ylmethyl)-amide,
- 10 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-amide,
- 15 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(5-hydroxy-pentyl)-amide,
- 20 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-[3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide,
- 25 ester éthylique de l'acide 4-*tert*-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 30 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-cyclopropylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 35 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 40 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 45 ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 50 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-(2-ethoxy-ethylamino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 55 ester éthylique de l'acide 4-benzylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 60 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenethylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 65 Parmi les dérivés de xanthine, on utilise en particulier (i) les (ω -1)-hydroxyalkyl-dialkylxanthine où le groupe (ω -1)-hydroxyalkyle contient 5 ou 6 atomes de carbone et est en position 1 ou 7, le groupe alkyle sur l'autre position 7 ou 1 contient de 1 à 12 atomes de carbone et le groupe alkyle en position 3 contient de 1 à 4 atomes de carbone, (ii) les (ω -1)-oxoalkyl-diméthylxanthine où le groupe (ω -1)-oxoalkyle contient 5 ou 6 atomes de carbone et est en position 1

ou 7, ou (iii) les dérivés de diméthylxanthine ayant un groupe alkyle contenant de 4 à 12 atomes de carbone ou un groupe benzyle en position 1 ou 7.

Typiquement, les oxoalkyl-dialkylxanthines incluent par exemple les 1-(5-oxohexyl)-3,7- and 7-(5-oxohexyl)-1,3-dimethylxanthines. D'autres xanthines peuvent être également utilisées telles que notamment les 3,7-dimethylxanthines et 1,3-dimethylxanthines substituées par un groupe butyle, isoamyle, hexyle, lauryle ou benzyle en position 1 ou 7, ainsi que les homologues de ces composés avec un groupe hydroxy ou oxo en position (ω -1)-position, ex. les 1-(4-hydroxypentyl)- et 1-(5-hydroxyhexyl)-3,7-diméthylxanthines, 7-(4-hydroxypentyl)- et 7-(5-hydroxyhexyl)-1,3-diméthylxanthines, 1-(4-oxopentyl)-, 1-(5-oxohexyl)-, 1-(2-methyl-3-oxobutyl)- et 1-(2-ethyl-3-oxobutyl)-3,7-diméthylxanthines et les composés 1,3-dimethyl correspondant présentant le groupe (ω -1)-hydroxyalkyl ou (ω -1)-oxoalkyl en position 7. Des homologues des hydroxyalkyl-diméthylxanthines mentionnés ci-dessus, sont ceux présentant en position 1 ou 7 qui n'est pas occupée par un groupe hydroxyalkyle, au lieu d'un groupe méthyle, un groupe alkyle ayant de 2 à 12 atomes de carbone, tel que 1-éthyl-, 1-propyl-, 1-butyl- et 1-isobutyl-3-méthyl-7-(5-hydroxyhexyl)-xanthines et 7-éthyl-, 7-propyl-, 7-butyl- et 7-isobutyl-1-(5-hydroxyhexyl)-3-méthylxanthines, et les composés correspondants présentant à la place du radical méthyl en position un groupe alkyle de 2 à 4 atomes de carbone, tel que notamment un radical éthyl, n-propyle, isopropyle, isobutyle ou n-butyle.

Parmi ces dérivés de xanthine, on utilise en particulier la pentoxifylline de formule suivante :



La présente invention propose donc, pour la première fois, la PDE4B comme cible thérapeutique pour le traitement des événements moléculaires associés à l'excitotoxicité. Selon des modes de mise en œuvre particuliers, l'invention peut être utilisée pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce 5 des maladies neurodégénératives. Elle est applicable notamment au traitement de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de l'ALS, de la chorée de Huntington ou de l'ischémie cérébrale.

D'autres objets de l'invention résident dans :

- 10 . l'utilisation des composés indiqués ci-dessus, en particulier de l'étazolate ou de la pentoxifylline, pour le traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de l'ALS, ou
15 . l'utilisation des composés indiqués ci-dessus, en particulier de la pentoxifylline ou de l'étazolate, pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de la PDE4B chez les patients atteints d'ALS.

L'invention concerne également des méthodes de traitement de l'ALS comprenant l'administration d'un composé inhibant sélectivement l'expression ou l'activité de la PDE4B de séquence SEQ ID n° 2 ou 4. De préférence, les 20 méthodes de l'invention sont utilisées pour le traitement en phase précoce des maladies neurodégénératives.

L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de préférence par voie orale ou par injection, typiquement par voie intra-péritonéale, intra-cérébrale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intra-musculaire. L'administration par voie orale est préférée. Les doses administrées peuvent 25 être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg / kg environ sont injectés, pour des composés inhibiteurs de nature chimique. Pour des composés nucléiques, les doses peuvent varier par exemple entre 0,01 mg 30 et 100 mg par dose. Il est entendu que des injections répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres agents actifs ou tout

véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (ex., tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.).

L'invention est utilisable chez les mammifères, notamment chez l'être humain.

- 5 Les résultats présentés dans les exemples illustrent l'efficacité d'inhibiteurs de PDE4B pour améliorer la viabilité de neurones placés en conditions d'excitotoxicité.

10 Méthodes de sélection et outils

D'autres objets de l'invention concernent des méthodes de sélection, identification ou caractérisation de composés actifs sur les pathologies associées à l'excitotoxicité, ou au stress neuronal, comprenant la mise en 15 contact de composés tests avec une cellule exprimant la PDE4B (notamment un variant dépourvu de domaine 3' non-codant), et la mise en évidence des composés inhibant l'expression ou l'activité de cette protéine.

Les méthodes peuvent être mises en œuvre avec différentes populations 20 cellulaires, telles que des cellules primaires ou des lignées de cellules d'origine mammifère (humaine, murine, etc.). On utilise avantageusement des cellules qui n'expriment pas naturellement la PDE4B, transfectées avec un acide nucléique codant le variant souhaité. De cette manière, la sélectivité de la méthode est augmentée. On peut également utiliser des cellules eucaryotes inférieures 25 (levure, etc.) ou des cellules procaryotes.

Les méthodes de screening peuvent également être réalisées en système acellulaire, par mesure de la capacité de composés tests à lier la PDE4B ou un variant ou fragment de celle-ci.

30

Un autre objet de l'invention concerne tout acide nucléique codant un polypeptide tel que défini ci-dessus, les vecteurs le contenant, cellules

recombinantes, et utilisations. Les vecteurs peuvent être des plasmides, phages, cosmides, virus, chromosomes artificiels, etc. Des vecteurs préférés sont par exemple des vecteurs plasmidiques, comme ceux dérivés de plasmides commerciaux (pUC, pcDNA, pBR, etc.). De tels vecteurs comportent 5 avantagereusement un gène de sélection et/ou une origine de réPLICATION et/ou un promoteur transcriptionnel. D'autres vecteurs particuliers sont par exemple des virus ou des phages, notamment des virus recombinants défectifs pour la réPLICATION, tels que des virus dérivés de rétrovirus, adénovirus, AAV, herpès-virus, baculovirus, etc. Les vecteurs peuvent être utilisés dans tout hôte 10 compétent, comme par exemple des cellules prokaryotes ou eukaryotes. Il peut s'agir de bactéries (par exemple *E. coli*), levures (par exemple *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*), cellules végétales, cellules d'insectes, cellules de mammifères, notamment humaines, etc. Il peut s'agir de lignées, cellules primaires, cultures mixtes, etc.

15

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

20

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1: PCR semi-quantitative de PDE4B à partir d'échantillons de cerveau (1A) et de muscle (1B).

25

Figure 2: La pentoxifylline protège les neurones primaires de granules cérébelleux de l'excitotoxicité induite par le kainate.

Figure 3: La pentoxifylline protège les neurones primaires de granules cérébelleux de l'excitotoxicité induite par NMDA/serine.

Figure 4: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les cellules granulaires du cervelet.

30

Figure 5: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 6: Effet neuroprotecteur de la pentoxyfylline sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les neurones corticaux.

Figure 7: Effet neuroprotecteur de la pentoxyfylline sur la toxicité induite par le kainate sur les neurones corticaux.

5 Figure 8: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les neurones corticaux.

Figure 9: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les neurones corticaux.

10 Figure 10: Effet neuroprotecteur du 8-bromo-cAMP sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 11: Effet neuroprotecteur du 8-bromo-cAMP sur la toxicité induite par le kainate sur les cellules granulaires du cervelet.

EXEMPLES

15

Exemple 1 : Identification de la PDE4 comme cible moléculaire de l'excitotoxicité

L'analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN poly adénylés
20 (poly A+) extraits d'échantillons de cerveaux d'animaux correspondant aux différents stades, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum d'évènements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie.

Les ARN poly A+ sont préparés selon des techniques connues de l'homme de métier.
25 Il peut s'agir en particulier d'un traitement au moyen d'agents chaotropiques tels que le thiocyanate de guanidium suivi d'une extraction des ARN totaux au moyen de solvants (phénol, chloroforme par exemple). De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier (voir Maniatis et al., Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156), et peuvent être aisément pratiquées en utilisant des kits disponibles dans le commerce. A partir de ces ARN totaux, les ARN poly A+ sont préparés selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier et proposées par des kits commerciaux.

Ces ARN poly A+ servent de matrice à des réactions de transcription inverse à l'aide de reverse transcriptase. Avantageusement sont utilisées des reverse transcriptases dépourvues d'activité RNase H qui permettent d'obtenir des premiers brins d'ADN complémentaire de tailles supérieures à ceux obtenus 5 avec des reverse transcriptases classiques. De telles préparations de reverse transcriptases sans activité RNase H sont disponibles commercialement.

Pour chaque point de la cinétique de développement de la pathologie (30 jours, 60 jours et 90 jours) les ARN poly A+ ainsi que les ADNc simple brins sont préparés à partir des animaux transgéniques (T) et des animaux contrôles 10 syngéniques (C).

Conformément à la technique DATAS, pour chaque point de la cinétique sont réalisées des hybridations d'ARNm (C) avec des ADNc (T) et des hybridations réciproques d'ARNm (T) avec des ADNc (C).

Ces hétéroduplex ARNm/ADNc sont ensuite purifiés selon les protocoles de la 15 technique DATAS.

Les séquences d'ARN non appariées avec un ADN complémentaire sont libérées de ces hétéroduplex sous l'action de la RNase H, cette enzyme dégradant les séquences d'ARN appariées. Ces séquences non appariées représentent les différences qualitatives qui existent entre des ARN par ailleurs 20 homologues entre eux. Ces différences qualitatives peuvent être localisées n'importe où sur la séquence des ARN, aussi bien en 5', 3' ou à l'intérieur de la séquence et notamment dans la séquence codante. Selon leur localisation, ces séquences peuvent être non seulement des modifications d'épissage mais également des conséquences de translocations ou de délétions.

25 Les séquences d'ARN représentant les différences qualitatives sont ensuite clonées selon les techniques connues de l'homme de métier et notamment celles décrites dans le brevet de la technique DATAS.

Ces séquences sont regroupées au sein de banques de cDNA qui constituent 30 des banques qualitatives différentes. Une de ces banques contient les exons et les introns spécifiques de la situation saine ; les autres banques contiennent les évènements d'épissage caractéristiques des conditions pathologiques.

L'expression différentielle des clones a été vérifiée par hybridation avec des sondes obtenues par reverse-transcription à partir d'ARN messagers extraits des différentes situations étudiées. Les clones hybrideant de façon différentielle ont été retenus pour analyse ultérieure. Les séquences identifiées par DATAS 5 correspondent à des introns et/ou à des exons exprimées de façon différentielle par épissage entre les situations pathologiques et la situation saine. Ces événements d'épissage peuvent être spécifiques d'une étape donnée du développement de la pathologie ou caractéristiques de l'état sain.

10 La comparaison de ces séquences avec les banques de données permet de classifier les informations obtenues et de proposer une sélection raisonnée des séquences selon leur intérêt diagnostique ou thérapeutique.

15 La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B. Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce 20 fragment recouvre les nucléotides 377 à 486 référencés à partir du codon stop de la PDE4B de souris (SEQ ID NO :1). Cette séquence comprend 2912 bases, le fragment délété correspondant aux bases 2760 à 2869. Cette région est non codante et est exprimée différemment entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques, du fait de l'utilisation alternative d'un exon 3' non codant ou du fait de l'utilisation de deux sites de polyadénylation alternatifs.

25

Exemple 2 : Expériences de RT-PCR : Confirmation de l'expression différentielle :

30 L'expression différentielle de la PDE4B dans une situation de stress neuronal, par rapport à une situation de référence, a été vérifiée par des expériences de RT PCR présentées sur la figure 1.

Ces expériences ont été réalisées selon des techniques bien connues de l'homme de métier et ont permis de suivre les expressions de deux régions distinctes de l'ARNm de la PDE4B. Une de ces régions recouvre le codon d'initiation de cet ARNm (PDE4B 5'), l'autre recouvre en partie le fragment identifié selon la technique DATAS (PDE4B DATAS). Les localisations des amorces de PCR utilisées sont indiquées sur la figure 1.

L'ARN PO correspond à un ARN ribosomal utilisé comme contrôle interne destiné à vérifier que la même quantité d'ARN est utilisée pour chaque point expérimental. Les analyses ont été réalisées à partir d'ARN extraits d'animaux contrôles (C) et transgéniques (T) âgés de 30, 60 et 90 jours, c'est à dire avant l'apparition des symptômes pathologiques.

Les ARN totaux du cerveau des souris contrôle ou SOD1 G93A âgées 30, 60 et 90 jours sont transcrits en ADNc utilisant le protocole standard de SuperscriptTM (Invitrogen). Pour les PCR semi-quantitatives les produits de la réaction de reverse transcription sont dilués 10 fois. Les amorces spécifiques du fragment DATAS correspondent pour le sens aux nucléotides 2526-2545 (5' GCC AGG CCG TGA AGC AAA TA 3' ; SEQ ID NO : 5), et pour l'anti-sens aux 2790-2807 (5' TCA AAG ACG CGA AAA CAT 3'; SEQ ID NO : 6) et pour le fragment plus en 3 prime les amorces correspondent pour le sens aux nucléotides 145-165 (5' CCG CGT CAG TGC CTT TGC TAT 3'; SEQ ID NO : 7), et pour l'anti-sens aux 426-404 (5' CGC TGT CGG ATG CTT TTA TTC AC 3'; SEQ ID NO : 8). Comme gène de référence le gène P0 est utilisé et amplifié par les amorces, sens : 5' TCG CTT TCT GGA GGG TGT C 3' (SEQ ID NO : 9) et anti-sens : CCG CAG GGG CAG CAG TGG 3' (SEQ ID NO :10).

L'amplification est effectuée par 30 cycles de PCR suivants :

- 30 secondes à 94°C
- une minute à 57°C
- 30 secondes à 72°C, suivi par un cycle de 2 minutes à 72°C

Les différents produits de PCR sont mis sur un gel d'agarose de 1.5 %. L'expérience est répétée trois fois avec deux réactions de reverse transcription différentes.

La figure 1 présente les résultats obtenus à partir d'ARN extraits des cerveaux ou des muscles des animaux.

Alors que la même quantité d'ADNc est amplifiée à partir de l'ARN de PO dans tous les échantillons, de variations sont observées pour l'ARNm de la PDE4B :

- 5 les variations les plus significatives sont détectées chez les animaux âgés de 90 jours : alors qu'une augmentation du niveau d'expression du fragment PDE4 5' est observée dans le cerveau des animaux transgéniques, une très forte diminution de l'expression de PDE4B (DATAS) est observée dans le cerveau des animaux transgéniques.
- 10 Ce résultat établit une corrélation entre la diminution de l'expression d'un fragment 3' non codant de l'ARNm de la PDE4B et l'augmentation de l'expression de la partie 5' codante de ce même messager. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS et démontre la corrélation entre 15 l'expression de PDE4B et le phénomène d'excitotoxicité.

Exemple 3 : Inhibition de l'excitotoxicité par des inhibiteurs de PDE4

Pour cet exemple, des neurones granulaires du cervelet de rat ainsi que des 20 neurones corticaux ont été mis en culture selon les techniques connues de l'homme de métier.

Culture primaire des cellules granulaires de cervelet :

Les rats Wistar âgés de sept jours sont décapités et leurs cervelets sont 25 disséqués. Après avoir enlevé les méninges, le tissu est coupé en petits morceaux et trypsinisé pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont dissociées par trituration et mises en cultures à une densité 300.000 cellules par cm² dans du milieu basal Eagle supplémenté avec 10% du sérum de veau fœtal et 2 mM glutamine. Le lendemain 10 µM ARA-C, un anti-mitotique, est ajouté pour 30 empêcher la prolifération des cellules gliales. Les cellules sont traitées le jour 9 de cultures avec les phosphodiesterase inhibiteurs, pentoxifylline et étazolate, trois heures avant l'addition des toxiques, 50 µM kainate ou 100 µM N-methyl-D-

aspartate en présence de 10 µM D-sérine. Le 8-bromo-cAMP est ajouté juste avant les toxiques. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à p inférieur ou égal à 0.05.

Cultures primaires des cellules corticales :

Des embryons de rat Wistar, âgés de 16 jours, sont prélevés et les cortex sont disséqués. Après la trypsination à 37°C pendant 25 minutes, les cellules sont dissociées par trituration. Les cellules sont ensemencées dans du milieu essentiel minimum, supplémenté avec 10% de sérum de cheval et 10% de sérum de veau fœtal et 2 mM glutamine, à une densité de 300.000 cellules par cm². Après 4 jours en culture la moitié du milieu est changée avec du milieu essentiel minimum supplémenté avec 5% de sérum de cheval et 2 mM glutamine. Le même jour, 10 µM de 5-fluoro-2-deoxyuridine, un anti-mitotique, est ajouté. Après sept et onze jours de culture, la moitié du milieu est changée par du milieu conditionné. Le milieu conditionné est composé de MEM contenant 5 % de sérum de cheval et 2 mM glutamine ; ce milieu est passé sur un tapis d'astrocytes corticales pendant une nuit avant son utilisation. A jour 14, les cellules sont traitées avec les phosphodiesterase inhibiteurs, pentoxifylline et étazolate, une heure avant l'addition des toxiques, 50 µM kainate ou 20 µM N-methyl-D-aspartate en présence de 10 µM D-sérine. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à p inférieur ou égal à 0.05.

30 MTT:

La toxicité est mesurée en utilisant le test MTT. Après l'incubation avec les composés, du MTT est ajouté à une concentration finale de 0.5 mg/ml par puits.

Les plaques sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37 °C dans le noir. Le milieu est aspiré et les cristaux sont resuspendus dans 500 µl de DMSO (dimethylsulfoxyde). L'absorbance à 550 nm est lue et le pourcentage de viabilité est calculé.

5

Résultats :

- Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 2-10. Ces résultats illustrent l'effet protecteur des composés de l'invention sur la survie neuronale. Lors du 10 co-traitement des neurones par un inhibiteur de PDE4, un effet protecteur dose-dépendant est observé dans les deux modes d'induction de l'excitotoxicité (NMDA/Serine et kainate). Un tel effet protecteur est observé à l'aide de la pentoxifylline et de l'étazolate.
- 15 Les figures 2 et 3 présentent des résultats obtenus à l'aide de la pentoxifylline sur les cellules granulaires du cervelet. Les résultats présentés montrent que la pentoxifylline permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 43% dans le cas du traitement NMDA/serine, et de 33% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.
- 20 Les figures 4 et 5 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les cellules granulaires du cervelet. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 60% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 57% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.
- 25 Les figures 6 et 7 présentent des résultats obtenus à l'aide de la pentoxifylline sur les neurones corticaux. Les résultats présentés montrent que la pentoxifylline permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 50% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 66% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.
- 30

Les figures 8 et 9 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les neurones corticaux. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 33% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 25% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

5

La pertinence de ces protections est attestée par les % de protection obtenus par des concentrations croissantes d'AMPc, substrat des PDE, donnés à titre d'exemple pour les cellules granulaires du cervelet sur les figures 10 et 11. Ces % sont de 40% pour le traitement NMDA/serine et de 40% pour le traitement 10 kainate.

10

La présente invention documente donc non seulement l'implication de la PDE4B dans les mécanismes d'excitotoxicité, notamment dans un modèle d'ALS, mais également la capacité d'inhibiteurs de PDE4 à préserver la viabilité neuronale 15 lors de stress liés à l'excitotoxicité.

15

Exemple 4 : Utilisation clinique chez l'homme

20

Cet exemple décrit les conditions d'une utilisation en clinique humaine d'un inhibiteur de PDE4, dans le traitement de l'ALS. Cet exemple illustre le potentiel thérapeutique de l'invention et ses conditions d'application à l'être humain.

25

Dans cet essai clinique, le traitement est basé sur une combinaison de pentoxifylline et de riluzole. La dose de pentoxifylline utilisée est de 400 mg par administration, sous forme de trois prises quotidiennes, soit une dose quotidienne totale de 1200 mg. La pentoxifylline est utilisée sous forme de comprimés. L'essai est multi-centrique et réalisé en double-aveugle contre placebo sur 400 patients. Les patients inclus dans l'essai sont des hommes ou des femmes âgés de 18 à 80 ans, atteints d'ALS sporadique ou familiale, et 30 sous traitement par le riluzole (50 mg b.i.d.) depuis 3 mois au moins. Le traitement à la pentoxifylline est prévu sur une durée de 18 mois.

L'efficacité est mesurée principalement par le taux de survie des patients, la qualité de vie, des tests musculaires.

D'autres aspects et applications de l'invention résident dans :

5

- l'utilisation de tout ou partie d'une séquence dérivée de l'ARN messager de la PDE4B à des fins de diagnostic ou de dépistage ou de caractérisation de pathologies neurodégénératives ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'excitotoxicité, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de 10 Parkinson, la sclérose en plaques, la chorée de Huntington, l'ALS ou l'ischémie cérébrale,

- l'utilisation de tout fragment d'acide nucléique y compris des ARN anti-sens dans le but d'inhiber l'expression de la PDE4B e chez les patients atteints de telles pathologies,

15 - l'utilisation de tout composé chimique, notamment de la pentoxifylline, de l'étazolate, ou de toute composition pharmaceutique les contenant, dans le but d'inhiber l'activité de la PDE4B chez les patients atteints de telles pathologies,

- l'utilisation de tout ou partie d'une séquence dérivée de l'ARN messager de la PDE4B à des fins de caractérisation du tissu et de la situation ischémique.

20

REVENDICATIONS

1. Méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure *in vitro* de l'expression de la phosphodiestérase 4, notamment de la phosphodiestérase 4B dans un échantillon provenant du sujet.
5
2. Méthode selon la revendication 1, comprenant la détection de la présence d'une forme mutée de l'ARN de la phosphodiestérase 4, notamment de la phosphodiestérase 4B dans un échantillon provenant du sujet, en particulier d'une forme délétée de tout ou partie de la région 3' non-codante.
10
3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, comprenant la mise en contact *in vitro* d'un échantillon biologique d'un sujet, contenant un acide nucléique, avec un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN messager de la PDE4B, et la détection de la formation d'un hybride.
15
4. Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'échantillon comprend des cellules nerveuses ou musculaires.
20
5. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour le diagnostic ou la détection de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de la chorée de Huntington, de l'ALS ou de l'ischémie cérébrale.
25
6. Utilisation d'au moins un composé inhibant ou réduisant l'expression ou l'activité de la PDE4, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies neurodégénératives.
- 30 7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le composé est un acide nucléique anti-sens capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou la traduction du messager correspondant.

8. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique.
- 5 9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le composé est choisi parmi les composés de la famille des pyrazolopyridines, en particulier l'étazolate, et les composés de la famille des dérivés de xanthine, en particulier la pentoxyfylline.
- 10 10. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 9, pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce des maladies neurodégénératives.
11. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 10, pour améliorer la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.
- 15 12. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 11, pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de la chorée de Huntington ou de l'ischémie cérébrale.
- 20 13. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 11, pour le traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de l'ALS.
14. Utilisation de la pentoxyfylline pour la préparation d'une composition destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.
- 25 15. Utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.
- 30 16. Utilisation d'au moins un composé inhibiteur de PDE4 appartenant à la famille des pyrazolopyridines, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints d'ALS.

17. Amorce nucléotidique, caractérisée en ce qu'elle est composée d'un fragment de 8 à 20 résidus consécutifs de la séquence comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence SEQ ID NO :1 ou entre les nucléotides 5 2461 et 4068 de la séquence SEQ ID NO :3 ou d'une séquence complémentaire de celles-ci.
18. Kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit 10 comprenant une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région 3' non-codante et une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de la région codante.
19. Kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, notamment de l'expression 15 différentielle entre la région 3' non-codante et la région codante, le kit comprenant un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région 3' non-codante de la PDE4 et un couple d'amorces nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de la région codante de la PDE4.

**Analyse d'expression d'isoforme de PDE4B dans le cerveau par
PCR semi-quantitative**

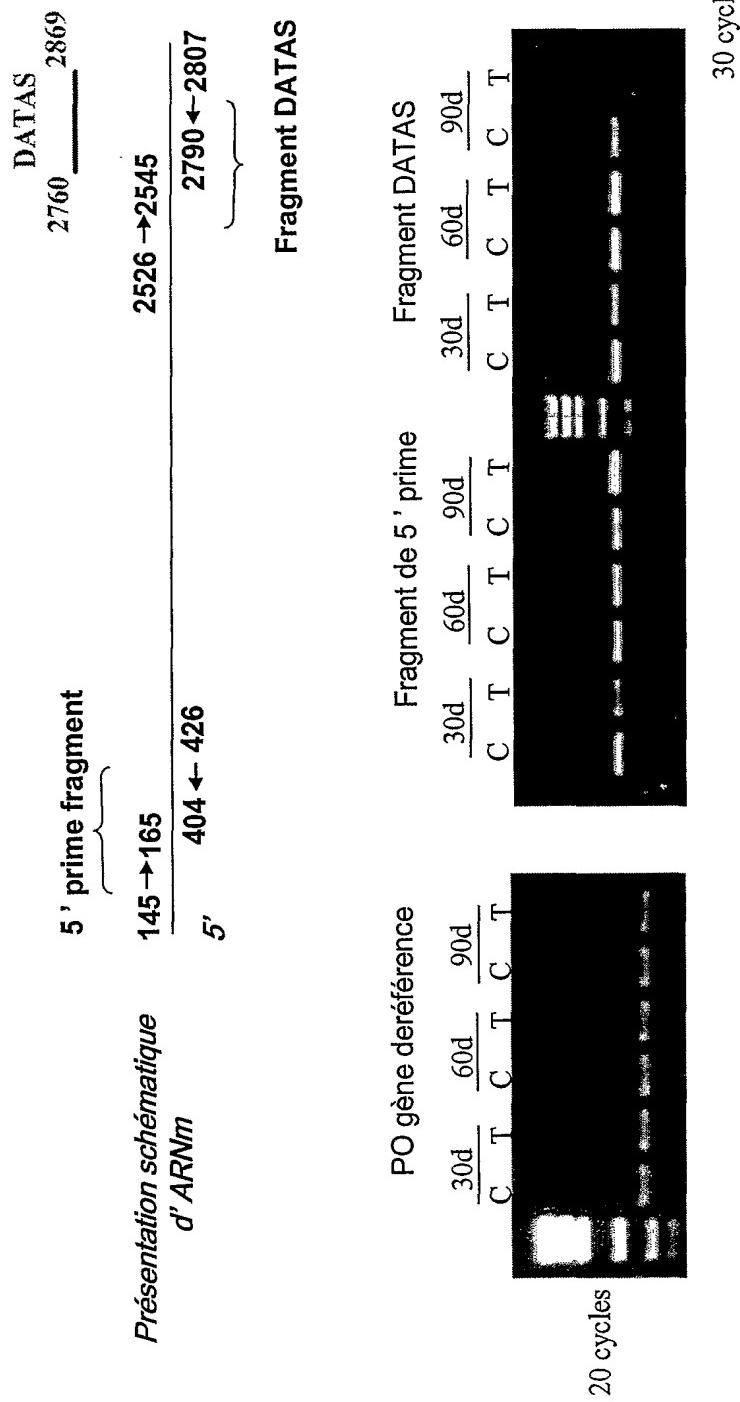


Figure 1A

2/12

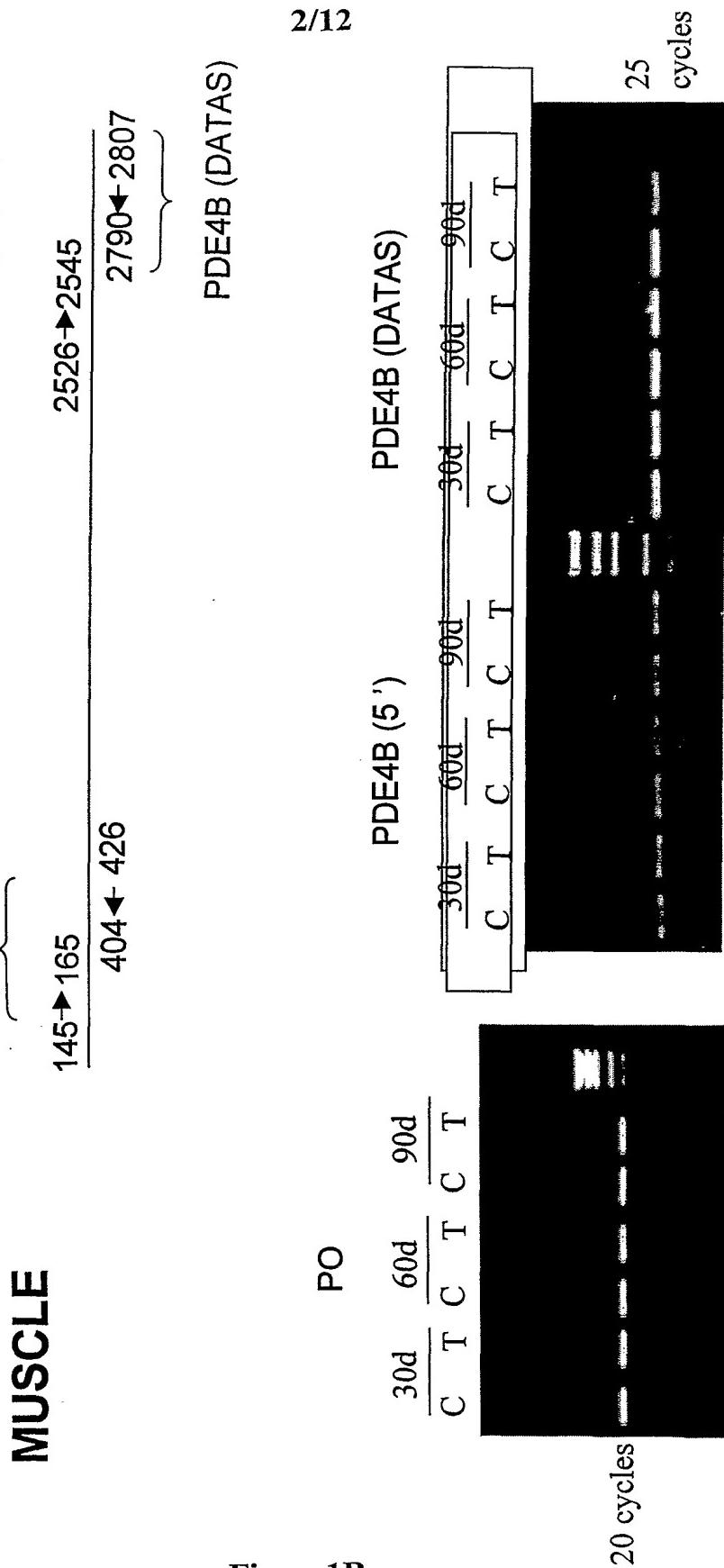
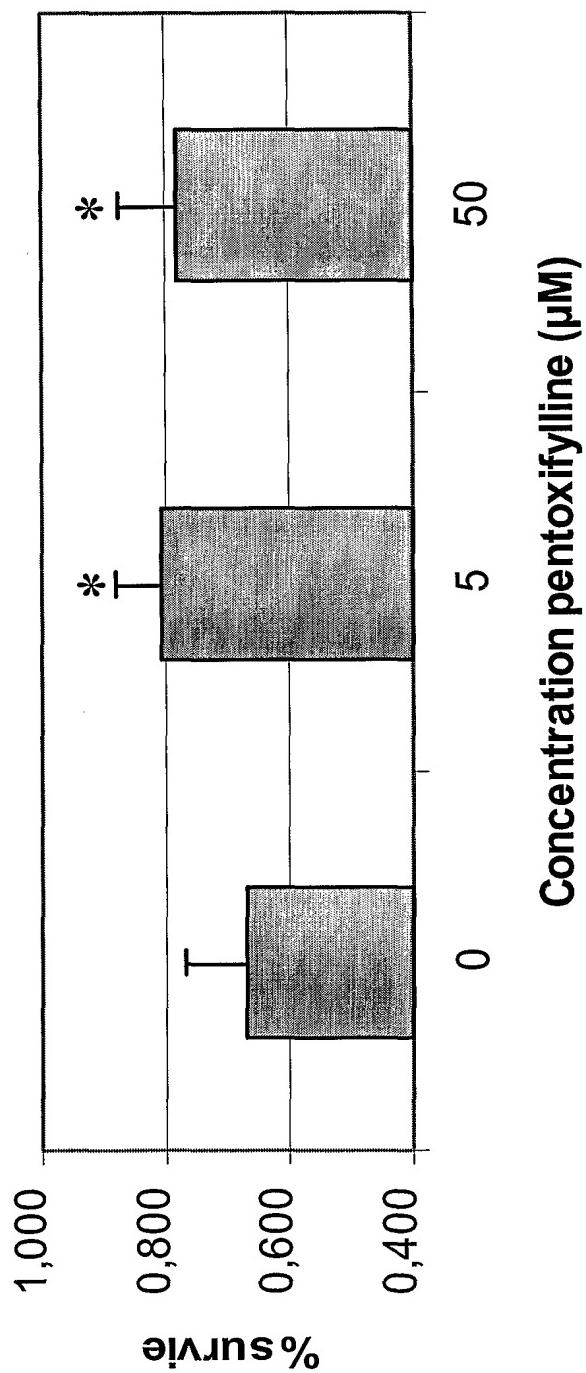


Figure1B

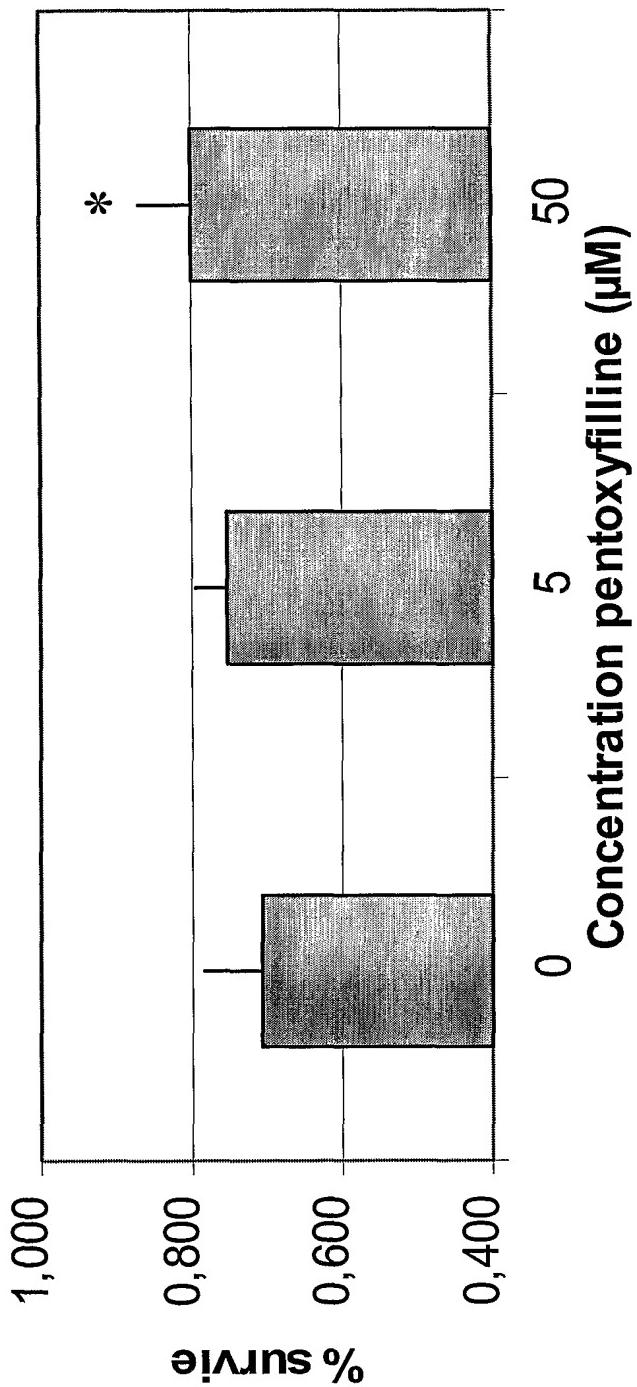
3/12



*: $p < 0.05$ Wilcoxon test

Figure 2

4/12



* : $p < 0.05$ Wilcoxon test

Figure 3

5/12

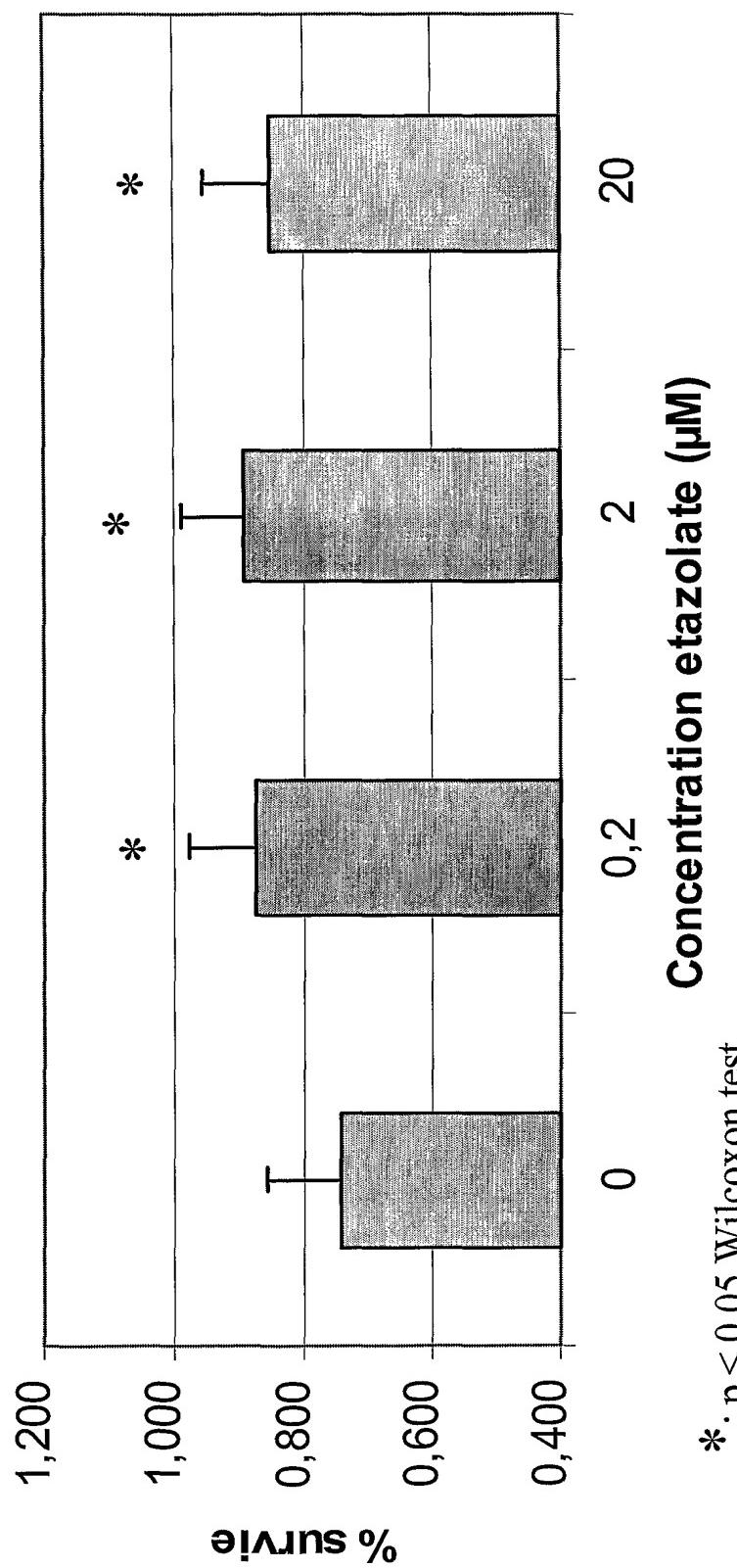


Figure 4

6/12

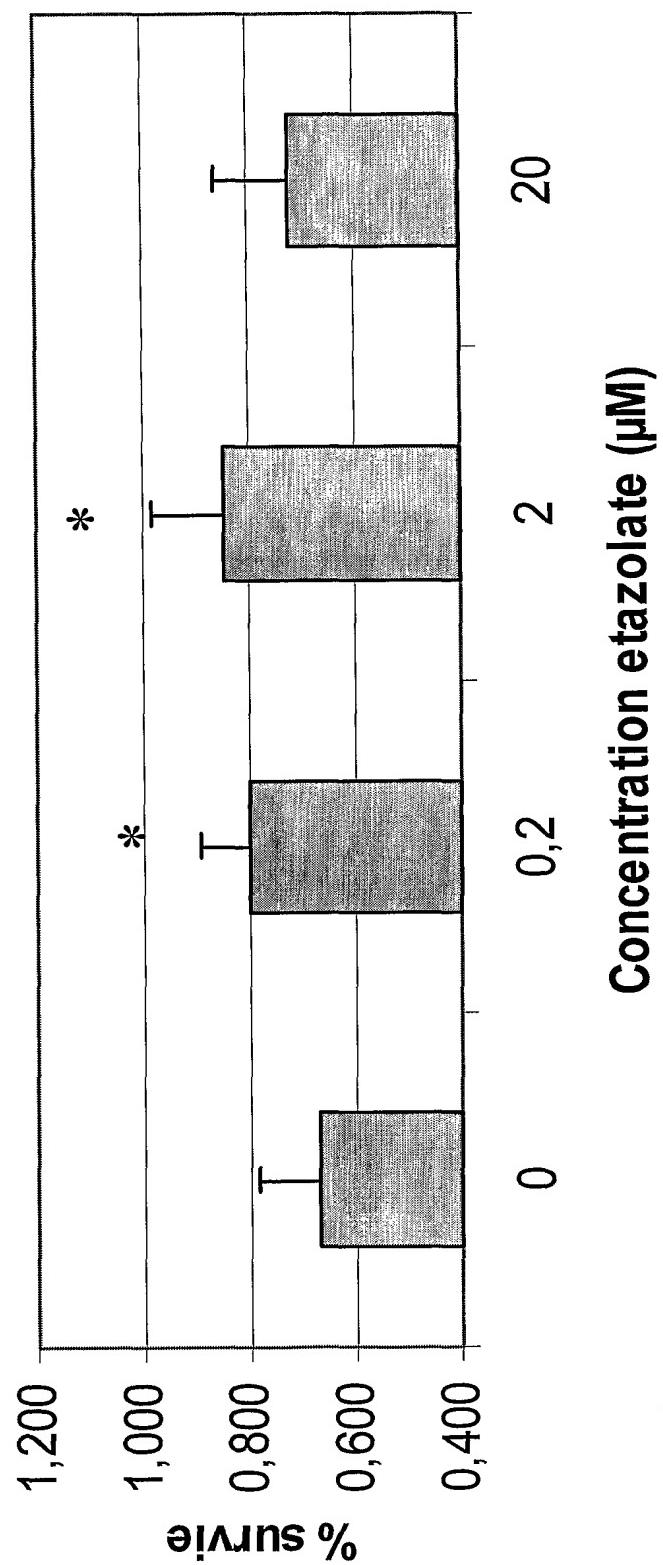
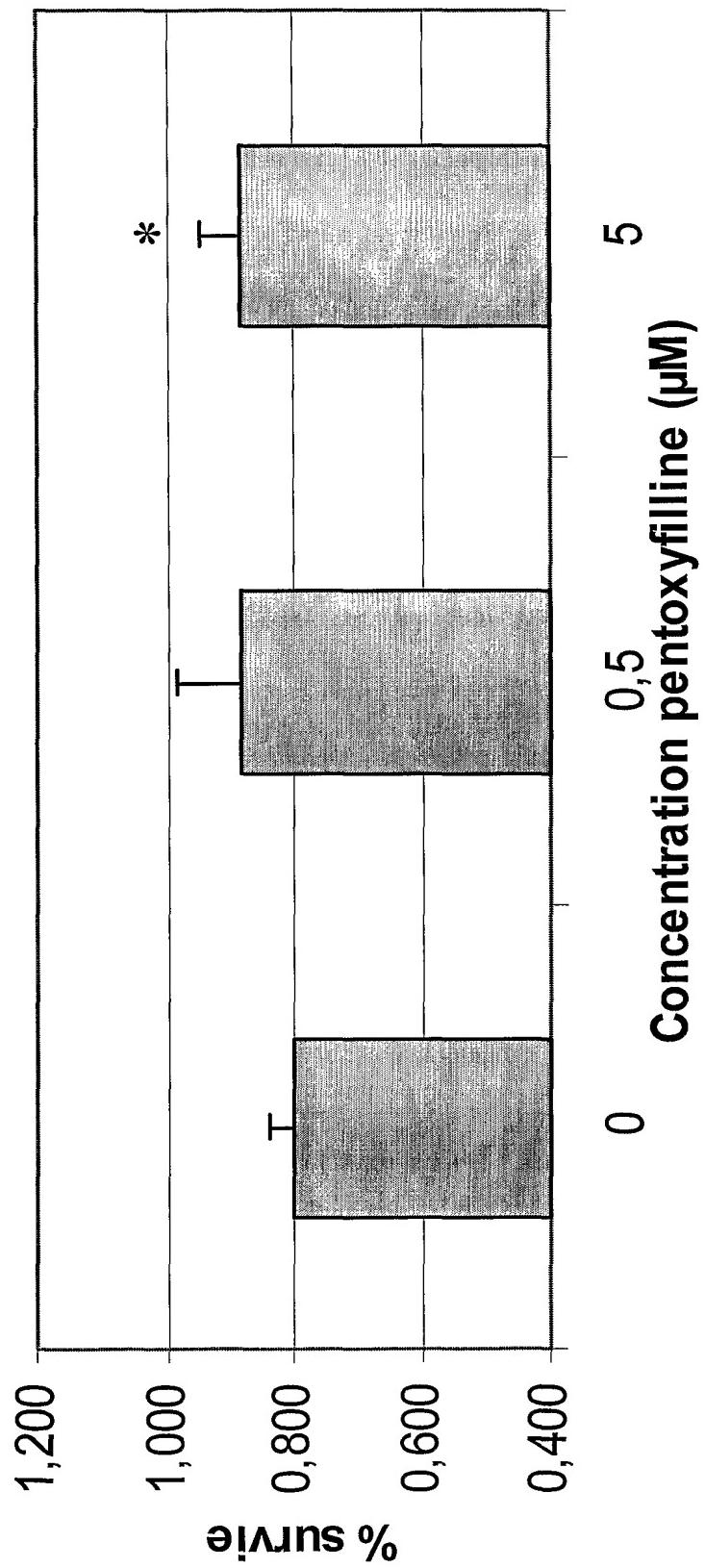


Figure 5

7/12



*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 6

8/12

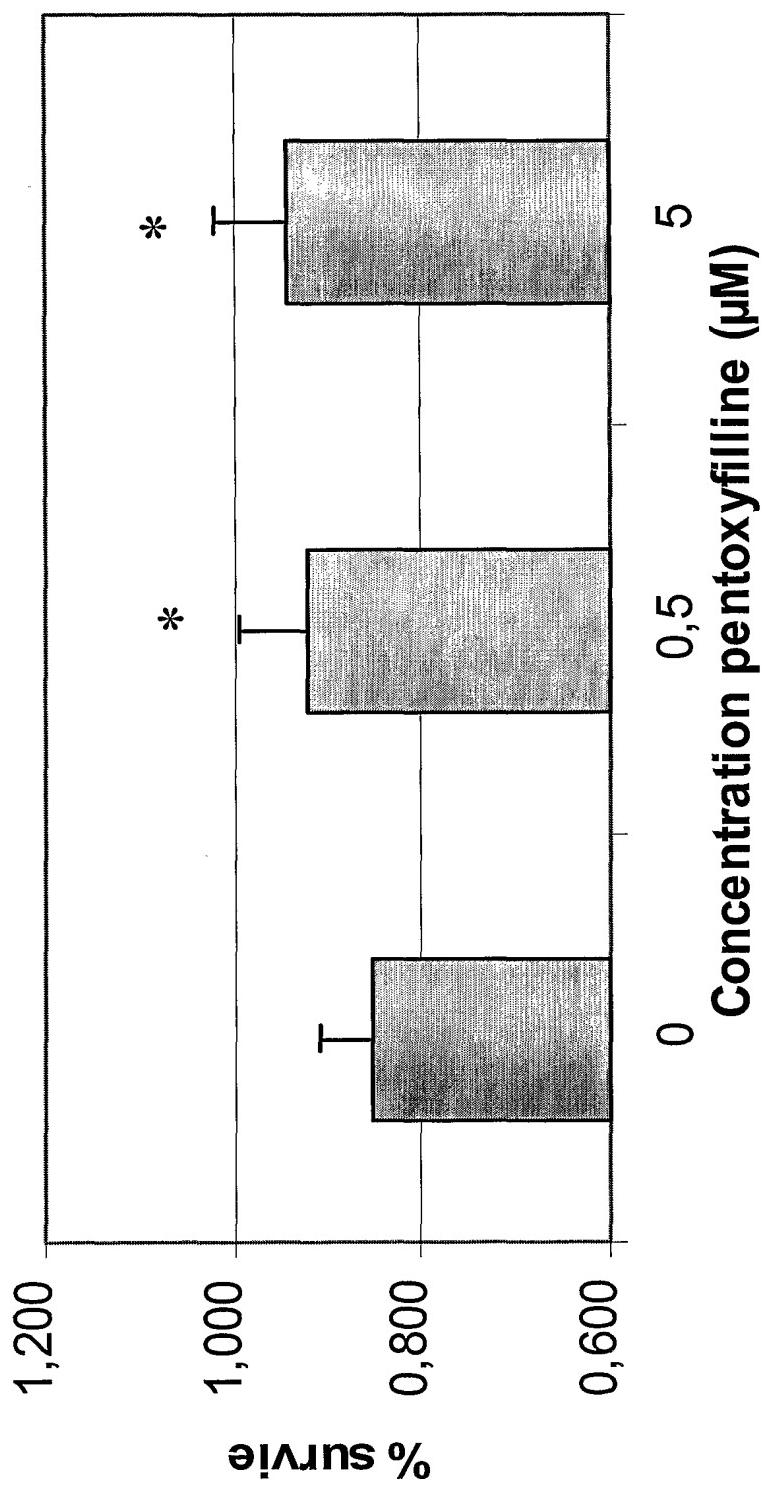
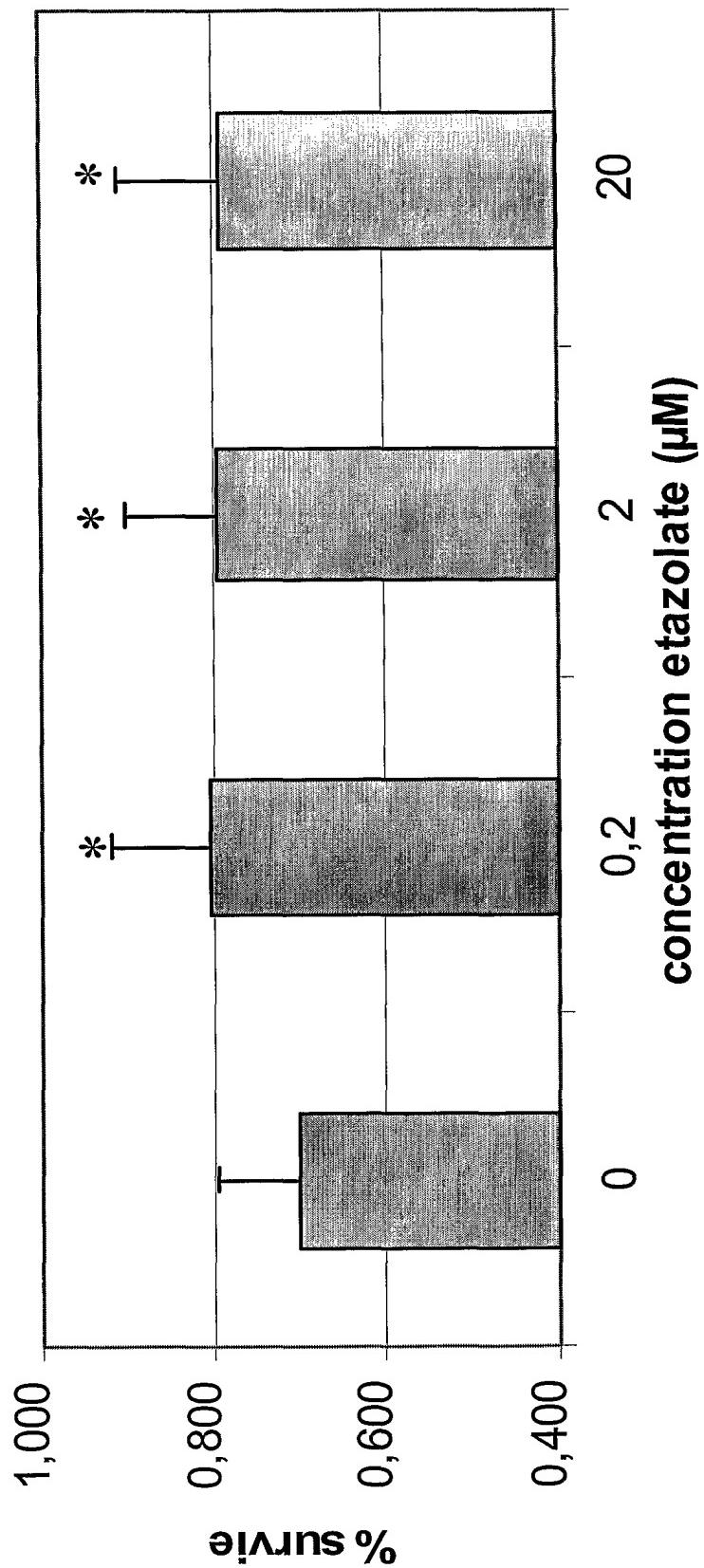


Figure 7

*: $p < 0.05$ Wilcoxon test

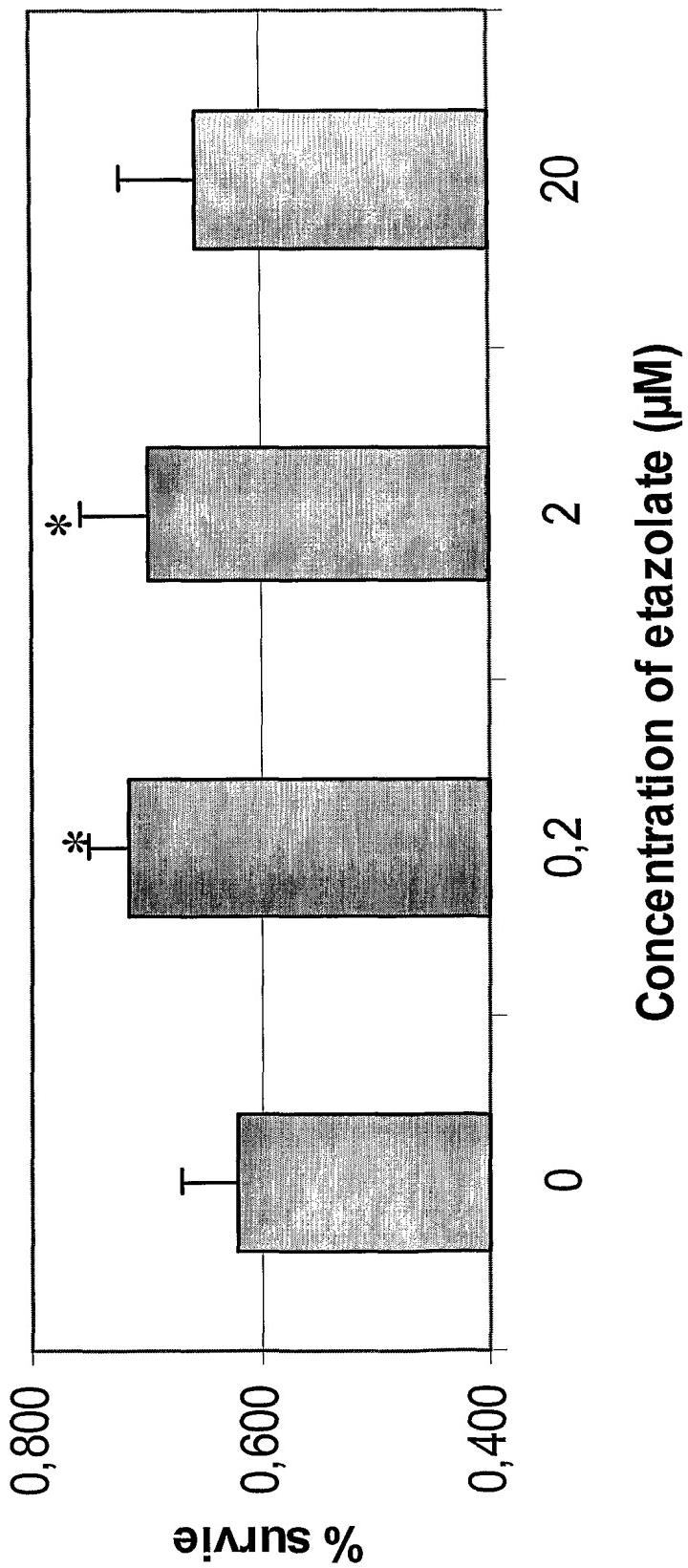
9/12



*: $p < 0.05$ Wilcoxon test

Figure 8

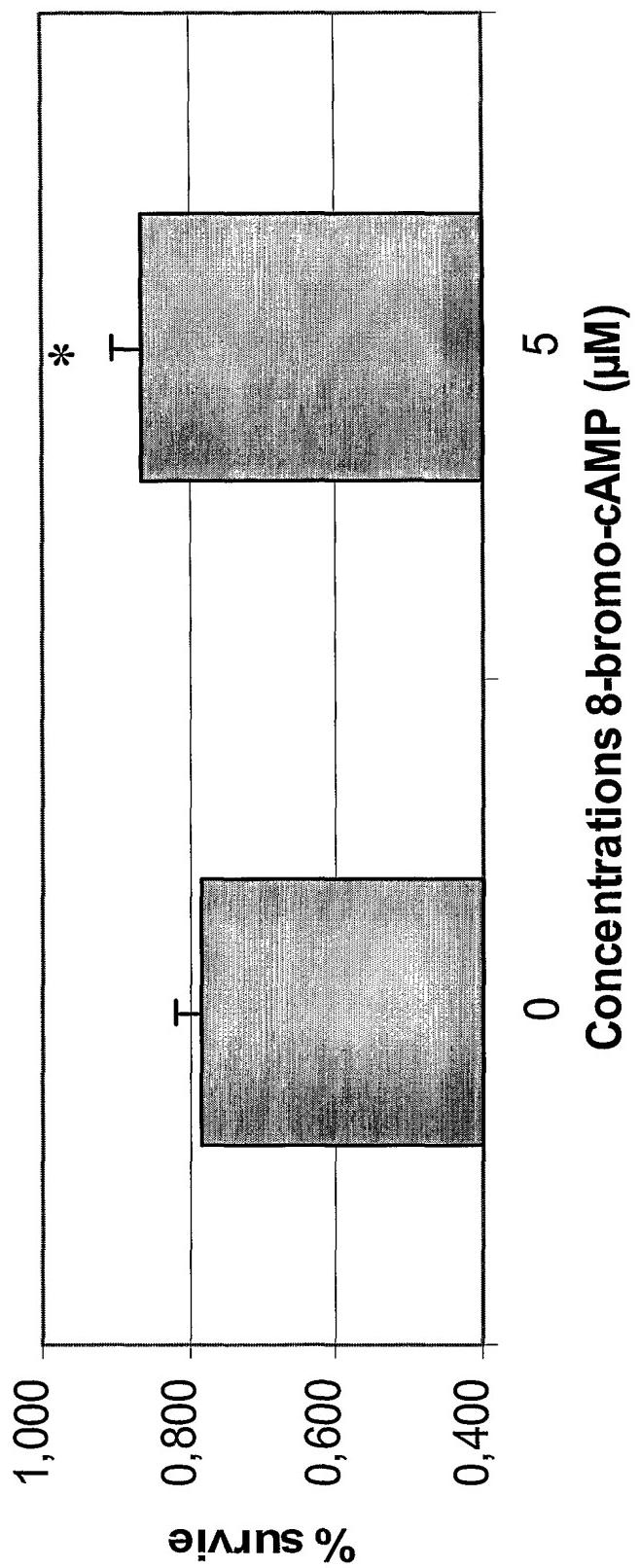
10/12



*: $p < 0.05$ Wilcoxon test

Figure 9

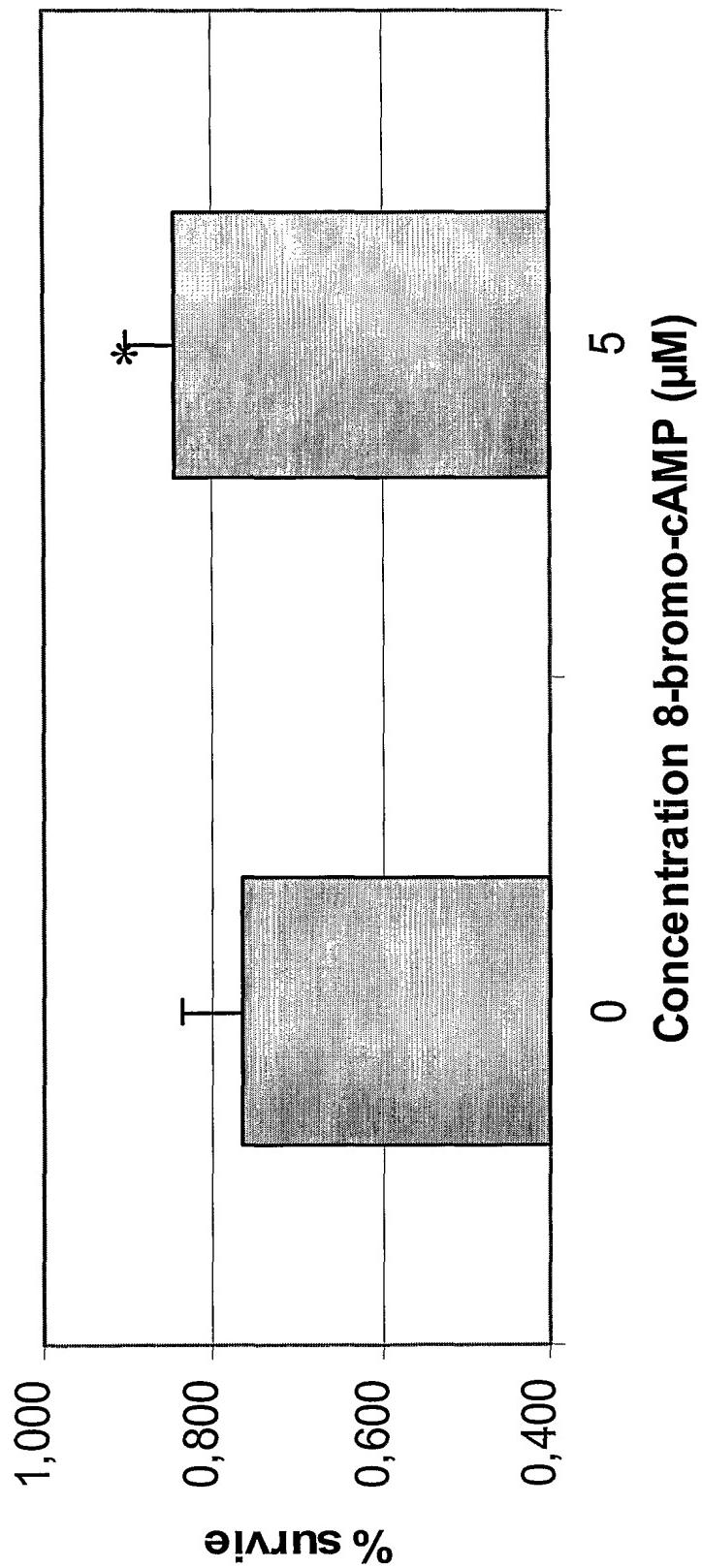
11/12



* : $p < 0.05$ Wilcoxon test

Figure 10

12/12



* : $p < 0.05$ Wilcoxon test

Figure 11

LISTE DE SEQUENCES

<110> Exonhit Therapeutics

<120> Nouvelle cible moléculaire de la Neurotoxicité

<130> B0100WO

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2912

<212> ADN

<213> souris

<220>

<221> CDS

<222> (218)..(2383)

<400> 1

aaaggcagcc tgataaaagct ctttgacca ggctgttgc ccagtctccc agtatgctcc 60

tcttgctctg aagtgcctca ggattgaaac cacagcttcc caaatttagcc tggaaagagt 120

gtgcggaccc agcagccctt taacccgcgt cagtgccttt gctatgttca agactgctgt 180

tttggatggt gaatgctagc tagcactcca tcgagac atg aca gca aaa aat tct 235

Met Thr Ala Lys Asn Ser

1

5

cca aaa gaa ttt act gct tcg gaa tct gag gtt tgc ata aag act ttc 283

Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu Val Cys Ile Lys Thr Phe

10

15

20

aag gag cag atg cgc ttg gaa ctt gag ctt cca aag cta cca gga aac 331

Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu Pro Lys Leu Pro Gly Asn

25

30

35

aga cct aca tct ccc aaa att tct cca cgc agt tca cca agg aat tca 379

Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg Ser Ser Pro Arg Asn Ser

40

45

50

cca tgc ttt ttc aga aag ttg ctg gtg aat aaa agc atc cga cag cgg 427

Pro Cys Phe Phe Arg Lys Leu Leu Val Asn Lys Ser Ile Arg Gln Arg			
55	60	65	70
cgt cgc ttc acg gtg gct cat aca tgc ttt gat gtg gaa aat ggc cct			475
Arg Arg Phe Thr Val Ala His Thr Cys Phe Asp Val Glu Asn Gly Pro			
75	80	85	
tct cca ggt cggt agc cca ctg gac cct caa gcc ggc tct tcg tcg gga			523
Ser Pro Gly Arg Ser Pro Leu Asp Pro Gln Ala Gly Ser Ser Ser Gly			
90	95	100	
ctg gta ctt cat gcc gcc ttt cct ggg cac agc cag cgc agg gag tcg			571
Leu Val Leu His Ala Ala Phe Pro Gly His Ser Gln Arg Arg Glu Ser			
105	110	115	
tcc ctc tac gat ctt gac agc gac tat gac ttg tca cca aaa gcg atg			619
Phe Leu Tyr Asp Leu Asp Ser Asp Tyr Asp Leu Ser Pro Lys Ala Met			
120	125	130	
tcc agg aac tca tca ctt ccc agt gag .caa cac ggc gat gac ctg att			667
Ser Arg Asn Ser Ser Leu Pro Ser Glu Gln His Gly Asp Asp Leu Ile			
135	140	145	150
gtc act cct ttt gcc cag gtt ctt gcc agc ttg cga agt gta aga aac			715
Val Thr Pro Phe Ala Gln Val Leu Ala Ser Leu Arg Ser Val Arg Asn			
155	160	165	
aac ttc acc ctg ctg acg aac ctt cat gga gcg ccg aac aag agg tca			763
Asn Phe Thr Leu Leu Thr Asn Leu His Gly Ala Pro Asn Lys Arg Ser			
170	175	180	
cca gcg gct agt cag gct cca gtc tcc aga gtc agc ctg caa gag gaa			811
Pro Ala Ala Ser Gln Ala Pro Val Ser Arg Val Ser Leu Gln Glu Glu			
185	190	195	
tca tat cag aaa cta gca atg gag acg ctg gag gaa cta gac tgg tgc			859
Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Trp Cys			
200	205	210	
cta gac cag cta gag acc atc cag acc tac cgc tct gtc agc gag atg			907
Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr Arg Ser Val Ser Glu Met			
215	220	225	230
gct tca aac aag ttc aaa agg atg ctg aac cgg gag ctg aca cac ctc			955
Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn Arg Glu Leu Thr His Leu			
235	240	245	
tca gag atg agc aga tca ggg aac cag cgt tct gag tac att tca aac			1003

Ser	Glu	Met	Ser	Arg	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Ser	Glu	Tyr	Ile	Ser	Asn	
250																250
acg	tcc	tta	gac	aag	cag	aac	gat	gtg	gaa	atc	cca	tct	ccc	acg	cag	1051
Thr	Phe	Leu	Asp	Lys	Gln	Asn	Asp	Val	Glu	Ile	Pro	Ser	Pro	Thr	Gln	
265																260
aag	gac	agg	gag	aag	aag	aag	cag	cag	ctc	atg	acc	cag	ata	agt		1099
Lys	Asp	Arg	Glu	Lys	Lys	Lys	Gln	Gln	Gln	Leu	Met	Thr	Gln	Ile	Ser	
280																275
295																305
gga	gtg	aag	aaa	ctg	atg	cac	agc	tca	agc	ctg	aac	aac	aca	agc	atc	1147
Gly	Val	Lys	Lys	Leu	Met	His	Ser	Ser	Ser	Leu	Asn	Asn	Thr	Ser	Ile	
300																310
tca	cgc	tcc	ggg	atc	aac	acg	gaa	aat	gag	gat	cat	cta	gcc	aag	gag	1195
Ser	Arg	Phe	Gly	Ile	Asn	Thr	Glu	Asn	Glu	Asp	His	Leu	Ala	Lys	Glu	
315																320
325																325
ctg	gaa	gac	ctg	aac	aaa	tgg	ggc	ctt	aac	atc	tcc	aat	gtg	gct	ggg	1243
Leu	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Trp	Gly	Leu	Asn	Ile	Phe	Asn	Val	Ala	Gly	
330																340
345																355
tac	tca	cat	aat	cgg	ccc	ctt	acg	tgc	atc	atg	tat	gca	ata	ttc	cag	1291
Tyr	Ser	His	Asn	Arg	Pro	Leu	Thr	Cys	Ile	Met	Tyr	Ala	Ile	Phe	Gln	
350																355
gaa	aga	gac	ctt	ctg	aag	acg	ttt	aaa	atc	tca	tct	gac	acc	ttt	gta	1339
Glu	Arg	Asp	Leu	Leu	Iys	Thr	Phe	Lys	Ile	Ser	Ser	Asp	Thr	Phe	Val	
360																365
370																370
acc	tac	atg	atg	act	tta	gaa	gac	cat	tac	cat	tct	gat	gtg	gca	tat	1387
Thr	Tyr	Met	Met	Thr	Leu	Glu	Asp	His	Tyr	His	Ser	Asp	Val	Ala	Tyr	
375																380
385																390
cac	aac	agc	ctg	cat	gct	gct	gac	gtg	gcc	cag	tca	act	cac	gtt	ctc	1435
His	Asn	Ser	Leu	His	Ala	Ala	Asp	Val	Ala	Gln	Ser	Thr	His	Val	Leu	
395																400
405																405
ctt	tct	acg	ccg	gca	ctg	gat	gct	gtc	tcc	aca	gac	ctg	gaa	atc	ctg	1483
Leu	Ser	Thr	Pro	Ala	Leu	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Leu	Glu	Ile	Leu	
410																415
420																420
gct	gcc	att	ttt	gca	gct	gcc	atc	cat	gat	gtc	gat	cat	cct	gga	gtc	1531
Ala	Ala	Ile	Phe	Ala	Ala	Ala	Ile	His	Asp	Val	Asp	His	Pro	Gly	Val	
425																430
435																435
tcc	aat	cag	ttt	ctc	atc	aat	aca	aat	tct	gaa	ctt	gct	ttg	atg	tat	1579

Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr				
440	445	450		
aat gat gaa tct gtt ctg gaa aac cat cac ctt gct gtg gga ttc aaa				1627
Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys				
455	460	465	470	
ttg cta caa gag gaa cac tgc gac atc ttt cag aat ctt acc aag aag				1675
Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe Gln Asn Leu Thr Lys Lys				
475	480	485		
caa cgc cag aca ctc agg aaa atg gtg att gac atg gtg ttg gca act				1723
Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr				
490	495	500		
gat atg tcc aaa cac atg agc ctc ctg gca gac ctt aaa aca atg gta				1771
Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val				
505	510	515		
gaa acc aag aag gtg aca agc tcc ggt gtt ctc ctc ctg gac aac tat				1819
Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val Leu Leu Asp Asn Tyr				
520	525	530		
act gac cgg ata cag gtt ctt cgc aac atg gta cac tgt gca gac ctg				1867
Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu				
535	540	545	550	
agc aac ccc acc aag tcc ttg gaa ttg tat cgg caa tgg acc gat cgt				1915
Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg				
555	560	565		
atc atg gag gag ttt ttc cag cag gga gac aaa gaa cgg gag agg gga				1963
Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly				
570	575	580		
atg gag att agc cca atg tgt gat aag cac aca gct tct gtg gaa aaa				2011
Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys				
585	590	595		
tcc cag gtt ggt ttc att gac tac att gtc cat cca ctg tgg gag acc				2059
Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr				
600	605	610		
tgg gca gac ctg gtt caa ccg gat gct caa gat att ctg gat aca cta				2107
Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu				
615	620	625	630	
gaa gat aac agg aac tgg tac cag agt atg ata ccc cag agc cct tcc				2155

Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser			
635	640	645	
ccg cca ctg gat gag agg agc agg gac tgc caa ggc ctg atg gag aag	2203		
Pro Pro Leu Asp Glu Arg Ser Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys			
650	655	660	
ttt cag ttt gaa ctg acc ctt gag gaa gag gat tct gag gga ccg gaa	2251		
Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu			
665	670	675	
aag gag gga gaa ggc cac agc tat ttc agc agc aca aag acg ctt tgt	2299		
Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys			
680	685	690	
gtg att gat cca gag aac agg gat tct ctg gaa gag act gac ata gac	2347		
Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Glu Glu Thr Asp Ile Asp			
695	700	705	710
att gca aca gaa gac aag tct ccg atc gac aca taa tctctctccc	2393		
Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Ile Asp Thr			
715	720		
tctgtgtgga gatgaacatt ccacccttga ctgagcatgc ccgctgagtg gtagggtcac	2453		
ctaccatggc caaggcctgc acaggacaaa ggccacctgg ccttccagt tacttgagtt	2513		
tggagccaga atgccaggcc gtgaagcaaa tagcagttcc atgctgtctt gccttgctg	2573		
caagcttggc ggagacccgc agctgtatgt ggtagtagag gccagttccc atcaaagcta	2633		
aaatggcttggaa aaaaacagagg acacaaagct gagagattgc tctgcactag gtgttggaa	2693		
gctgtcctga cagatgactg aactcactaa caacttcatc tataaatctc accacccaac	2753		
ccatttgtctg ccaacctgtg tgcccttttt tgtaaaatgt ttgcgtct ttgaaatgcc	2813		
tgttgaatat ctagagtttta gtaccaactt ctacaaacctt tttttagtct ttcttgaaaa	2873		
acaaa	2912		

<210> 2
<211> 721
<212> PRT
<213> souris

<400> 2

Met Thr Ala Lys Asn Ser Pro Lys Glu Phe Thr Ala Ser Glu Ser Glu
 1 5 10 15
 Val Cys Ile Lys Thr Phe Lys Glu Gln Met Arg Leu Glu Leu Glu Leu
 20 25 30
 Pro Lys Leu Pro Gly Asn Arg Pro Thr Ser Pro Lys Ile Ser Pro Arg
 35 40 45
 Ser Ser Pro Arg Asn Ser Pro Cys Phe Phe Arg Lys Leu Leu Val Asn
 50 55 60
 Lys Ser Ile Arg Gln Arg Arg Arg Phe Thr Val Ala His Thr Cys Phe
 65 70 75 80
 Asp Val Glu Asn Gly Pro Ser Pro Gly Arg Ser Pro Leu Asp Pro Gln
 85 90 95
 Ala Gly Ser Ser Ser Gly Leu Val Leu His Ala Ala Phe Pro Gly His
 100 105 110
 Ser Gln Arg Arg Glu Ser Phe Leu Tyr Asp Leu Asp Ser Asp Tyr Asp
 115 120 125
 Leu Ser Pro Lys Ala Met Ser Arg Asn Ser Ser Leu Pro Ser Glu Gln
 130 135 140
 His Gly Asp Asp Leu Ile Val Thr Pro Phe Ala Gln Val Leu Ala Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Ser Val Arg Asn Asn Phe Thr Leu Leu Thr Asn Leu His Gly
 165 170 175
 Ala Pro Asn Lys Arg Ser Pro Ala Ala Ser Gln Ala Pro Val Ser Arg
 180 185 190
 Val Ser Leu Gln Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu
 195 200 205
 Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr
 210 215 220
 Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn
 225 230 235 240
 Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val
 245 250 255
 Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu
 260 265 270
 Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Gln Gln
 275 280 285
 Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser
 290 295 300
 Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Ile Asn Thr Glu Asn Glu
 305 310 315 320
 Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn
 325 330 335
 Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile
 340 345 350
 Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Lys Ile
 355 360 365
 Ser Ser Asp Thr Phe Val Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr
 370 375 380

His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala
 385 390 395 400
 Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe
 405 410 415
 Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp
 420 425 430
 Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser
 435 440 445
 Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His
 450 455 460
 Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe
 465 470 475 480
 Gln Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile
 485 490 495
 Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala
 500 505 510
 Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val
 515 520 525
 Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met
 530 535 540
 Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr
 545 550 555 560
 Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp
 565 570 575
 Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His
 580 585 590
 Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val
 595 600 605
 His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln
 610 615 620
 Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met
 625 630 635 640
 Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Arg Ser Arg Asp Cys
 645 650 655
 Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Glu Glu Glu
 660 665 670
 Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser Tyr Phe Ser
 675 680 685
 Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu
 690 695 700
 Glu Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Ile Asp
 705 710 715 720
 Thr

<210> 3

<211> 4068

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (766) .. (2460)

<223> PDE4B

<400> 3

gaattcctcc tctcttcacc ccgttagctg ttttcaatgt aatgtcgccg tccttctt 60

gcactgcctt ctgcgctaac acctccattc ctgtttataa ccgtgtatTTT attacttaat 120

gtatataatg taatgttttg taagttatta atttatataat ctaacattgc ctgccaatgg 180

tggtgttaaa ttgtgtaga aaactctgcc taagagttac gacttttct tgtaatgttt 240

tgtattgtgt attatataac ccaaacgtca cttagtagag acatatggcc cccttggcag 300

agaggacagg ggtgggcttt tgttcaaagg gtctgccctt tccctgcctg agttgctact 360

tctgcacaac ccctttatga accagtttc acccgaaatt tgactgttc atttagaaga 420

aaagcaaaat gagaaaaagc tttcctcatt ttccttgag atggcaaagc actcagaaaat 480

gacatcacat accctaaaga accctgggat gactaaggca gagagagtct gagaaaactc 540

tttggtgctt ctgccttag ttttaggaca catttatgca gatgagctt taagagaccc 600

ttccctccgc ctttttcctc agaggaagtt tcttggtaga tcaccgacac ctcatccagg 660

cgggggggttg gggggaaact tggcaccagc catcccaggc agagcaccac tgtgatttgt 720

tctcctggtg gagagagctg gaaggaagga gccagcgtgc aaata atg aag gag cac 777

Met Lys Glu His

1

ggg ggc acc ttc agt agc acc gga atc agc ggt ggt agc ggt gac tct 825
Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly Ser Gly Asp Ser

5

10

15

20

gct atg gac agc ctg cag ccg ctc cag cct aac tac atg cct gtg tgt 873
Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr Met Pro Val Cys

25

30

35

ttg ttt gca gaa gaa tct tat caa aaa tta gca atg gaa acg ctg gag 921
Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met Glu Thr Leu Glu

40

45

50

gaa tta gac tgg tgt tta gac cag cta gag acc ata cag acc tac cgg Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile Gln Thr Tyr Arg	55	60	969
		65	
tct gtc agt gag atg gct tct aac aag ttc aaa aga atg ctg aac cgg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg Met Leu Asn Arg	70	75	1017
		80	
gag ctg aca cac ctc tca gag atg agc cga tca ggg aac cag gtg tct Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly Asn Gln Val Ser	85	90	1065
		95	
		100	
gaa tac att tca aat act ttc tta gac aag cag aat gat gtg gag atc Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn Asp Val Glu Ile	105	110	1113
		115	
cca tct cct acc cag aaa gac agg gag aaa aag aaa aag cag cag ctc Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys Gln Gln Leu	120	125	1161
		130	
atg acc cag ata agt gga gtg aag aaa tta atg cat agt tca agc cta Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His Ser Ser Ser Leu	135	140	1209
		145	
aac aat aca agc atc tca cgc ttt gga gtc aac act gaa aat gaa gat Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr Glu Asn Glu Asp	150	155	1257
		160	
cac ctg gcc aag gag ctg gaa gac ctg aac aaa tgg ggt ctt aac atc His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp Gly Leu Asn Ile	165	170	1305
		175	
		180	
ttt aat gtg gct gga tat tct cac aat aga ccc cta aca tgc atc atg Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu Thr Cys Ile Met	185	190	1353
		195	
tat gct ata ttc cag gaa aga gac ctc cta aag aca ttc aga atc tca Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr Phe Arg Ile Ser	200	205	1401
		210	
tct gac aca ttt ata acc tac atg atg act tta gaa gac cat tac cat Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu Asp His Tyr His	215	220	1449
		225	
tct gac gtg gca tat cac aac agc ctg cac gct gct gat gta gcc cag Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala Asp Val Ala Gln	230	235	1497
		240	

tcg acc cat gtt ctc ctt tct aca cca gca tta gac gct gtc ttc aca 1545
 Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp Ala Val Phe Thr
 245 250 255 260

gat ttg gag atc ctg gct gcc att ttt gca gct gcc atc cat gac gtt 1593
 Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala Ile His Asp Val
 265 270 275

gat cat cct gga gtc tcc aat cag ttt ctc atc aac aca aat tca gaa 1641
 Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn Thr Asn Ser Glu
 280 285 290

ctt gct ttg atg tat aat gat gaa tct gtg ttg gaa aat cat cac ctt 1689
 Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu Asn His His Leu
 295 300 305

gct gtg ggt ttc aaa ctg ctg caa gaa cac tgt gac atc ttc atg 1737
 Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys Asp Ile Phe Met
 310 315 320

aat ctc acc aag aag cag cgt cag aca ctc agg aag atg gtt att gac 1785
 Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys Met Val Ile Asp
 325 330 335 340

atg gtg tta gca act gat atg tct aaa cat atg agc ctg ctg gca gac 1833
 Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser Leu Leu Ala Asp
 345 350 355

ctg aag aca atg gta gaa acg aag aaa gtt aca agt tca ggc gtt ctt 1881
 Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser Ser Gly Val Leu
 360 365 370

ctc cta gac aac tat acc gat cgc att cag gtc ctt cgc aac atg gta 1929
 Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu Arg Asn Met Val
 375 380 385

cac tgt gca gac ctg agc aac ccc acc aag tcc ttg gaa ttg tat cgg 1977
 His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu Glu Leu Tyr Arg
 390 395 400

caa tgg aca gac cgc atc atg gag gaa ttt ttc cag cag gga gac aaa 2025
 Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln Gln Gly Asp Lys
 405 410 415 420

gag cgg gag agg gga atg gaa att agc cca atg tgt gat aaa cac aca 2073
 Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys Asp Lys His Thr
 425 430 435

gct tct gtg gaa aaa tcc cag gtt ggt ttc atc gac tac att gtc cat 2121
 Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp Tyr Ile Val His
 440 445 450

cca ttg tgg gag aca tgg gca gat ttg gta cag cct gat gct cag gac 2169
 Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro Asp Ala Gln Asp
 455 460 465

att ctc gat acc tta gaa gat aac agg aac tgg tat cag agc atg ata 2217
 Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr Gln Ser Met Ile
 470 475 480

cct caa agt ccc tca cca cca ctg gac gag cag aac agg gac tgc cag 2265
 Pro Gln Ser Pro Ser Pro Leu Asp Glu Gln Asn Arg Asp Cys Gln
 485 490 495 500

ggt ctg atg gag aag ttt cag ttt gaa ctg act ctc gat gag gaa gat 2313
 Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu Asp Glu Glu Asp
 505 510 515

tct gaa gga cct gag aag gag gga gag gga cac agc tat ttc agc agc 2361
 Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu His Ser Tyr Phe Ser Ser
 520 525 530

aca aag acg ctt tgt gtg att gat cca gaa aac aga gat tcc ctg gga 2409
 Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg Asp Ser Leu Gly
 535 540 545

gag act gac ata gac att gca aca gaa gac aag tcc ccc gtg gat aca 2457
 Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser Pro Val Asp Thr
 550 555 560

taa tccccctctc cctgtggaga tgaacattct atccttgatg agcatgccag 2510
 565

ctatgtggta gggccagccc accatggggg ccaagacctg cacaggacaa gggccacctg 2570

gcctttcagt tacttgagtt tggagtcaga aagcaagacc aggaagcaaa tagcagctca 2630

ggaaatcca cggttgactt gccttgatgg caagcttggt ggagagggt gaagctgtt 2690

ctgggggccc attctgatca agacacatgg cttgaaaatg gaagacacaa aactgagaga 2750

tcattctgca ctaagttcg ggaacctatc cccgacagtg actgaactca ctgactaata 2810

acttcattta tgaatcttct cacttgtccc tttgtctgcc aacctgtgtg cctttttgt 2870

aaaacatttt catgtcttta aaatgcctgt tgaatacctg gagtttagta tcaacttcta 2930
cacagataag ctttcaaagt tgacaaacctt ttttgactct ttctggaaaa gggaaagaaa 2990
atagtcttcc ttctttcttg ggcaatatcc ttcactttac tacagttact tttgcaaaca 3050
gacagaaagg atacacttct aaccacattt tacttccttc ccctgttgta cagtc当地 3110
ccacagtcac tcttaaaact tctctgtt tgcctgcctc caacagtact tttaaactttt 3170
tgctgtaaac agaataaaaat tgaacaaatt agggggtaga aaggagcagt ggtgtcggtt 3230
accgtgagag tctgcataga actcagcagt gtgcctgtt gtgtcttggc ccctgcccc 3290
cacaggagtt gctacagtcc ctggccctgc ttcccattcct cctctttca ccccgtagc 3350
tgttttcaat gtaatgctgc cgttcttctc ttgcactgcc ttctgctgta acacctccat 3410
tcctgttat aaccgtgtat ttattactta atgtatataa tgtaatgtt tgtaagttat 3470
taatttatat atctaacatt gcctgccaat ggtgggttta aatttgtgtta gaaaactctg 3530
cctaagagtt acgactttt cttgtaatgt tttgtattgt gtattatata acccaaacgt 3590
cacttagtag agacatatgg cccccttggc agagaggaca ggggtgggct tttgttcaaa 3650
gggtctgccc ttccctgac tgagttgctt cttctgcaca acccccttat gaaccagttt 3710
tgaaaacaat atttcacat tagataactaa atggtttata ctgagttttt tacttttgta 3770
tagcttgata gggcaggggg caatggatg tagttttac ccaggttctt tccaaatctt 3830
tgtggccatg agttgggtta taactggatc ctactatcat tgtggctttg gttcaaaagg 3890
aaacactaca tttgctcaca gatgattctt ctgatttttc tgaatgctcc cgaactactg 3950
actttgaaga ggtggctcc tgcctgccc taagcaggaa tgtcatgttc cagttcatta 4010
caaaaagaaaa caataaaaaca atgtgaattt ttataataaa aaaaaaaaaa aggaattt 4068

<210> 4
<211> 564
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Lys Glu His Gly Gly Thr Phe Ser Ser Thr Gly Ile Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Gly Asp Ser Ala Met Asp Ser Leu Gln Pro Leu Gln Pro Asn Tyr
 20 25 30
 Met Pro Val Cys Leu Phe Ala Glu Glu Ser Tyr Gln Lys Leu Ala Met
 35 40 45
 Glu Thr Leu Glu Glu Leu Asp Trp Cys Leu Asp Gln Leu Glu Thr Ile
 50 55 60
 Gln Thr Tyr Arg Ser Val Ser Glu Met Ala Ser Asn Lys Phe Lys Arg
 65 70 75 80
 Met Leu Asn Arg Glu Leu Thr His Leu Ser Glu Met Ser Arg Ser Gly
 85 90 95
 Asn Gln Val Ser Glu Tyr Ile Ser Asn Thr Phe Leu Asp Lys Gln Asn
 100 105 110
 Asp Val Glu Ile Pro Ser Pro Thr Gln Lys Asp Arg Glu Lys Lys Lys
 115 120 125
 Lys Gln Gln Leu Met Thr Gln Ile Ser Gly Val Lys Lys Leu Met His
 130 135 140
 Ser Ser Ser Leu Asn Asn Thr Ser Ile Ser Arg Phe Gly Val Asn Thr
 145 150 155 160
 Glu Asn Glu Asp His Leu Ala Lys Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Trp
 165 170 175
 Gly Leu Asn Ile Phe Asn Val Ala Gly Tyr Ser His Asn Arg Pro Leu
 180 185 190
 Thr Cys Ile Met Tyr Ala Ile Phe Gln Glu Arg Asp Leu Leu Lys Thr
 195 200 205
 Phe Arg Ile Ser Ser Asp Thr Phe Ile Thr Tyr Met Met Thr Leu Glu
 210 215 220
 Asp His Tyr His Ser Asp Val Ala Tyr His Asn Ser Leu His Ala Ala
 225 230 235 240
 Asp Val Ala Gln Ser Thr His Val Leu Leu Ser Thr Pro Ala Leu Asp
 245 250 255
 Ala Val Phe Thr Asp Leu Glu Ile Leu Ala Ala Ile Phe Ala Ala Ala
 260 265 270
 Ile His Asp Val Asp His Pro Gly Val Ser Asn Gln Phe Leu Ile Asn
 275 280 285
 Thr Asn Ser Glu Leu Ala Leu Met Tyr Asn Asp Glu Ser Val Leu Glu
 290 295 300
 Asn His His Leu Ala Val Gly Phe Lys Leu Leu Gln Glu Glu His Cys
 305 310 315 320
 Asp Ile Phe Met Asn Leu Thr Lys Lys Gln Arg Gln Thr Leu Arg Lys
 325 330 335
 Met Val Ile Asp Met Val Leu Ala Thr Asp Met Ser Lys His Met Ser
 340 345 350
 Leu Leu Ala Asp Leu Lys Thr Met Val Glu Thr Lys Lys Val Thr Ser
 355 360 365
 Ser Gly Val Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Thr Asp Arg Ile Gln Val Leu
 370 375 380

Arg Asn Met Val His Cys Ala Asp Leu Ser Asn Pro Thr Lys Ser Leu
 385 390 395 400
 Glu Leu Tyr Arg Gln Trp Thr Asp Arg Ile Met Glu Glu Phe Phe Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asp Lys Glu Arg Glu Arg Gly Met Glu Ile Ser Pro Met Cys
 420 425 430
 Asp Lys His Thr Ala Ser Val Glu Lys Ser Gln Val Gly Phe Ile Asp
 435 440 445
 Tyr Ile Val His Pro Leu Trp Glu Thr Trp Ala Asp Leu Val Gln Pro
 450 455 460
 Asp Ala Gln Asp Ile Leu Asp Thr Leu Glu Asp Asn Arg Asn Trp Tyr
 465 470 475 480
 Gln Ser Met Ile Pro Gln Ser Pro Ser Pro Pro Leu Asp Glu Gln Asn
 485 490 495
 Arg Asp Cys Gln Gly Leu Met Glu Lys Phe Gln Phe Glu Leu Thr Leu
 500 505 510
 Asp Glu Glu Asp Ser Glu Gly Pro Glu Lys Glu Gly Glu Gly His Ser
 515 520 525
 Tyr Phe Ser Ser Thr Lys Thr Leu Cys Val Ile Asp Pro Glu Asn Arg
 530 535 540
 Asp Ser Leu Gly Glu Thr Asp Ile Asp Ile Ala Thr Glu Asp Lys Ser
 545 550 555 560
 Pro Val Asp Thr

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 5
 gccaggccgt gaagcaaata 20

<210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 6
 tcaaagacgc gaaaacat 18

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 7
ccgcgtcagt gcctttgcta t

21

<210> 8
<211> 23
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 8
cgctgtcgga tgcttttatt cac

23

<210> 9
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 9
tcgctttctg gaggggtgtc

19

<210> 10
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 10
ccgcaggggc agcagtgg

18

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
27 février 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2003/016563 A3

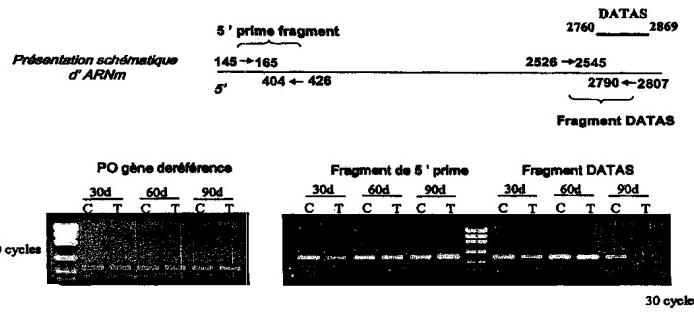
- (51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68,** C12N 9/16
- (21) Numéro de la demande internationale :** PCT/FR2002/002861
- (22) Date de dépôt international :** 13 août 2002 (13.08.2002)
- (25) Langue de dépôt :** français
- (26) Langue de publication :** français
- (30) Données relatives à la priorité :**
01/10819 14 août 2001 (14.08.2001) FR
- (63) Apparenté(e) par continuation (CON) ou par continuation partielle (CIP) à une demande antérieure :**
US 09/983,754 (CIP)
Déposée le Non communiquée
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :** EX-ONHIT THERAPEUTICS SA [FR/FR]; 26, rue Brunel, F-75017 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et**
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : AÏT IKHLEF, Ali [FR/FR]; 1, rue de l'Eglise, 91940 Gometz Le Châtel (FR). RESINK, Annelies [NL/FR]; 48, rue Bobillot, F-75013 Paris (FR). SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 38, avenue Paul Déroulède, F-94300 Vincennes (FR).
- (74) Mandataires :** BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).
- (81) États désignés (national) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: NOVEL MOLECULAR TARGET FOR NEUROTOXICITY

(54) Titre : CIBLE MOLECULAIRE DE LA NEUROTOXICITE

**Analyse d'expression d'Isoforme de PDE4B dans le cerveau par
PCR semi-quantitative**



A

ANALYSE...:-ANALYSIS OF EXPRESSION OF PDE4B ISOFORMS IN THE BRAIN BY SEMI-QUANTITATIVE PCR

PRÉSENTATION SCHÉMATIQUE...:- SCHEMATIC ARNm REPRESENTATION

PO GÉNE...:- PO REFERENCE GENE

FRAGMENT DE 5' PRIME:- 5' PRIME FRAGMENT

FRAGMENT DATAS:- DATAS FRAGMENT

RESTE IDEM

(57) Abstract: The invention relates to the field of biology, genetics and medicine and to novel methods of detecting, characterising and/or treating (or managing) neurodegenerative pathologies, particularly amyotrophic lateral sclerosis. Said invention also relates to methods of identifying or screening active compounds in said pathologies. Moreover, the invention relates to compounds, genes, cells, plasmids or compositions that can be used to carry out the above-mentioned methods. In particular, the invention outlines the role of PDE4B in said pathologies and the use thereof as a therapeutic, diagnostic or experimental target.

[Suite sur la page suivante]

WO 2003/016563 A3



SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés (regional)** : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) **Date de publication du rapport de recherche
internationale:**

1 avril 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en oeuvre des méthodes ci-dessus. L'invention décrit notamment le rôle de PDE4B dans ces pathologies et son utilisation comme cible thérapeutique, diagnostique ou expérimentale.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 02/02861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12Q1/68 C12N9/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, MEDLINE, EPO-Internal, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHERRY J A ET AL: "Diazepam and rolipram differentially inhibit cyclic AMP-specific phosphodiesterases PDE4A1 and PDE4B3 in the mouse" <i>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION</i>, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1518, no. 1-2, 19 March 2001 (2001-03-19), pages 27-35, XP004275852 ISSN: 0167-4781 page 27 -page 28, left-hand column; figures 1,3,4; table 1 & DATABASE EMBL 'Online' ebi; 23 December 1999 (1999-12-23) XP002248838 abstract --- ---</p>	1,6,8,17

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 July 2003

Date of mailing of the international search report

31/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/FR 02/02861

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 977 305 A (COLICELLI JOHN J ET AL) 2 November 1999 (1999-11-02) SEQ ID NOS: 23,24 & 58 column 3, line 41 -column 6, line 3 column 7, line 40 -column 9, line 35 column 10, line 38 -column 11, line 21 examples 5,11 ---	1-6,8, 18,19
X	WO 00 40714 A (ARROW AMY ;OLIGOS ETC INC (US); THOMPSON TERRY (US); DALE RODERIC) 13 July 2000 (2000-07-13) page 1, line 1 -page 4, line 25; claims 1-11 ---	6-8
X	MISHRA S K ET AL: "CALCIUM CALMODULIN AND 3' 5' CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY IN HUMAN MUSCULAR DISORDERS" JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES, vol. 109, no. 2, June 1992 (1992-06), pages 215-218, XP001064869 ISSN: 0022-510X abstract; table 1 ---	1
A	US 5 851 784 A (PERRY MARTIN JOHN ET AL) 22 December 1998 (1998-12-22) column 1, line 16 -column 6, line 13 ---	1-19
A	WO 01 44449 A (UNIV UTAH RES FOUND ;BOLGER GRAEME (US)) 21 June 2001 (2001-06-21) SEQ ID NO: 11 page 7, line 7 -page 8, line 24; claims 1-18; example 1 ---	1-19
A	US 6 060 501 A (GRAF HERMANN ET AL) 9 May 2000 (2000-05-09) column 4, line 29 - line 65 ---	1-19
A	PRICE D L ET AL: "AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND ALZHEIMER'S DISEASE LESSONS FROM MODEL SYSTEMS" REVUE NEUROLOGIQUE, MASSON, PARIS, FR, vol. 153, no. 8/9, September 1997 (1997-09), pages 484-495, XP000982876 ISSN: 0035-3787 abstract page 486 -page 488, left-hand column -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 02/02861

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5977305	A 02-11-1999	US 6100025 A		08-08-2000
		US 5527896 A		18-06-1996
		US 6080540 A		27-06-2000
		US 6069240 A		30-05-2000
		AT 204603 T		15-09-2001
		CA 2080920 A1		21-10-1991
		DE 69132701 D1		27-09-2001
		DE 69132701 T2		20-06-2002
		DK 666314 T3		10-12-2001
		EP 0537173 A1		21-04-1993
		EP 0666314 A1		09-08-1995
		EP 0940469 A2		08-09-1999
		ES 2165397 T3		16-03-2002
		HK 1013314 A1		10-05-2002
		JP 11253200 A		21-09-1999
		JP 3258635 B2		18-02-2002
		JP 11239481 A		07-09-1999
		JP 5507196 T		21-10-1993
		WO 9116457 A1		31-10-1991
		US 6569617 B1		27-05-2003
-----	-----	-----	-----	-----
WO 0040714	A 13-07-2000	AU 2480800 A		24-07-2000
		CA 2357950 A1		13-07-2000
		EP 1141278 A2		10-10-2001
		JP 2002534086 T		15-10-2002
		US 2003045490 A1		06-03-2003
		WO 0040714 A2		13-07-2000
-----	-----	-----	-----	-----
US 5851784	A 22-12-1998	AU 4270596 A		19-07-1996
		CA 2182946 A1		04-07-1996
		EP 0746619 A1		11-12-1996
		WO 9620281 A1		04-07-1996
		GB 2301363 A ,B		04-12-1996
		JP 9509851 T		07-10-1997
		US 6291199 B1		18-09-2001
-----	-----	-----	-----	-----
WO 0144449	A 21-06-2001	AU 2433001 A		25-06-2001
		WO 0144449 A1		21-06-2001
-----	-----	-----	-----	-----
US 6060501	A 09-05-2000	AU 699085 B2		19-11-1998
		AU 2266295 A		16-11-1995
		CA 2188269 A1		02-11-1995
		EP 0758233 A1		19-02-1997
		WO 9528926 A1		02-11-1995
		JP 2001508020 T		19-06-2001
-----	-----	-----	-----	-----

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°
PCT/FR 02/02861

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q1/68 C12N9/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12Q C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, Sequence Search, MEDLINE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHERRY J A ET AL: "Diazepam and rolipram differentially inhibit cyclic AMP-specific phosphodiesterases PDE4A1 and PDE4B3 in the mouse"</p> <p>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. GENE STRUCTURE AND EXPRESSION, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1518, no. 1-2, 19 mars 2001 (2001-03-19), pages 27-35, XP004275852</p> <p>ISSN: 0167-4781</p> <p>page 27 - page 28, colonne de gauche; figures 1,3,4; tableau 1</p> <p>& DATABASE EMBL</p> <p>ebi; 23 décembre 1999 (1999-12-23), XP002248838</p> <p>abrégé</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1,6,8,17

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'un individu)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achovée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14 janvier 2004

31 07 2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

van Klompenburg, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 02/02861

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 977 305 A (COLICELLI JOHN J ET AL) 2 novembre 1999 (1999-11-02) SEQ ID NOS: 23,24 & 58 colonne 3, ligne 41 - colonne 6, ligne 3 colonne 7, ligne 40 - colonne 9, ligne 35 colonne 10, ligne 38 - colonne 11, ligne 21 exemples 5,11 -----	1-6,8, 18,19
X	WO 00/40714 A (ARROW AMY ;OLIGOS ETC INC (US); THOMPSON TERRY (US); DALE RODERIC) 13 juillet 2000 (2000-07-13) page 1, ligne 1 - page 4, ligne 25; revendications 1-11 -----	6-8
X	MISHRA S K ET AL: "CALCIUM CALMODULIN AND 3' 5' CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY IN HUMAN MUSCULAR DISORDERS" JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES, vol. 109, no. 2, juin 1992 (1992-06), pages 215-218, XP001064869 ISSN: 0022-510X abrégé; tableau 1 -----	1
A	US 5 851 784 A (PERRY MARTIN JOHN ET AL) 22 décembre 1998 (1998-12-22) colonne 1, ligne 16 - colonne 6, ligne 13 -----	1-19
A	WO 01/044449 A (UNIV UTAH RES FOUND ;BOLGER GRAEME (US)) 21 juin 2001 (2001-06-21) SEQ ID NO: 11 page 7, ligne 7 - page 8, ligne 24; revendications 1-18; exemple 1 -----	1-19
A	US 6 060 501 A (GRAF HERMANN ET AL) 9 mai 2000 (2000-05-09) colonne 4, ligne 29 - ligne 65 -----	1-19
A	PRICE D L ET AL: "AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS AND ALZHEIMER'S DISEASE LESSONS FROM MODEL SYSTEMS" REVUE NEUROLOGIQUE, MASSON, PARIS, FR, vol. 153, no. 8/9, septembre 1997 (1997-09), pages 484-495, XP000982876 ISSN: 0035-3787 abrégé page 486 - page 488, colonne de gauche -----	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 02/02861

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US 5977305	A	02-11-1999	US 6100025 A US 5527896 A US 6080540 A US 6069240 A AT 204603 T CA 2080920 A1 DE 69132701 D1 DE 69132701 T2 DK 666314 T3 EP 0537173 A1 EP 0666314 A1 EP 0940469 A2 ES 2165397 T3 HK 1013314 A1 JP 11253200 A JP 3258635 B2 JP 11239481 A JP 5507196 T WO 9116457 A1 US 6569617 B1		08-08-2000 18-06-1996 27-06-2000 30-05-2000 15-09-2001 21-10-1991 27-09-2001 20-06-2002 10-12-2001 21-04-1993 09-08-1995 08-09-1999 16-03-2002 10-05-2002 21-09-1999 18-02-2002 07-09-1999 21-10-1993 31-10-1991 27-05-2003
WO 0040714	A	13-07-2000	AU 2480800 A CA 2357950 A1 EP 1141278 A2 JP 2002534086 T US 2003045490 A1 WO 0040714 A2		24-07-2000 13-07-2000 10-10-2001 15-10-2002 06-03-2003 13-07-2000
US 5851784	A	22-12-1998	AU 4270596 A CA 2182946 A1 EP 0746619 A1 WO 9620281 A1 GB 2301363 A ,B JP 9509851 T US 6291199 B1		19-07-1996 04-07-1996 11-12-1996 04-07-1996 04-12-1996 07-10-1997 18-09-2001
WO 0144449	A	21-06-2001	AU 2433001 A WO 0144449 A1		25-06-2001 21-06-2001
US 6060501	A	09-05-2000	AT 255413 T AU 699085 B2 AU 2266295 A CA 2188269 A1 DE 69532238 D1 EP 1380291 A1 EP 0758233 A1 WO 9528926 A1 JP 2001508020 T		15-12-2003 19-11-1998 16-11-1995 02-11-1995 15-01-2004 14-01-2004 19-02-1997 02-11-1995 19-06-2001